

COLUMBIA LIBRARIES OFFSITE



CU05548179



D614.4 ★ C33

Columbia University  
in the City of New York

LIBRARY

BUTLER



BIOLOGICAL SCIENCES LIBRARY  
COLUMBIA UNIVERSITY















# CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten.

---

Erste Abteilung. 61. Band.

Originale.





**CENTRALBLATT**  
für  
**Bakteriologie, Parasitenkunde**  
**und Infektionskrankheiten.**

---

In Verbindung mit

**Geh. Med.-Rat Professor Dr. Loeffler**  
in Greifswald,

**Geh. Med.-Rat Professor Dr. R. Pfeiffer**  
in Breslau

und

**Geh. Reg.-Rat Professor Dr. M. Braun**  
in Königsberg

herausgegeben von

**Prof. Dr. Oscar Uhlworm in Berlin.**

---

**Erste Abteilung. 61. Band.**

**Medizinisch-hygienische Bakteriologie und tierische Parasitenkunde.**

**Originale.**

**Mit 13 Tafeln und 41 Abbildungen im Texte.**

---

**J e n a ,**  
**Verlag von Gustav Fischer.**  
**1912.**





# Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 61. Heft 1/2.

Ausgegeben am 23. November 1911.

*Nachdruck verboten.*

## Die Rolle der Gärungspilze in der Aetiologie des Typhus.

[Aus dem bakteriologischen Institut der Universität Budapest.

(Direktor: Prof. Dr. Hugo Preisz.)]

Von **Felix Gál**, Praktikanten am Institut.

Die zahlreichen Versuche, welche darauf hinzielten, das Verhalten des Typhusbacillus im tierischen Organismus aufzuklären, namentlich diejenigen, welche entscheiden sollten, ob der Typhusbacillus auf das Tier pathogen einwirkt und ob es möglich ist, mit demselben bei Tieren ähnliche Veränderungen hervorzubringen, wie sie beim menschlichen Typhus beobachtet werden, haben eigentlich zu keinem positiven Ergebnisse geführt. Einige Forscher hatten zwar nach Einführung von Typhusbacillen bei Tieren Veränderungen wahrgenommen und sogar eine mäßige Vermehrung der Keime feststellen können; der größere Teil der einschlägigen Versuche war jedoch solcher Natur, daß sie auf den Menschen nicht bezogen werden konnten. Die intraperitoneale, bzw. subkutane oder intravenöse Infektion, welche Fränkel und Simmonds, Seitz, Pfeiffer und Kolle sowie andere anwendeten, entsprechen schon infolge des Weges der Infektion nicht den beim Menschen obwaltenden Verhältnissen, und der 6–8-stündige Symptomenkomplex, welchen sie an der Maus, oder der 24-stündige, welchen sie am Kaninchen hervorriefen, weist mit dem menschlichen Typhus keinerlei Ähnlichkeit auf. Chantemesse und Ramond, ferner Remlinger, haben sich den menschlichen Verhältnissen schon so weit genähert, daß sie die Bakterien in den Magen einführten. Die Tiere sind auch nach einigen Wochen eingegangen. Sie konnten dies jedoch nur so erreichen, daß sie die Tiere längere Zeit mit einer kolossalen Menge von Bakterien fütterten. Bei der Sektion fanden sie eine Darmhyperämie und eine Anschwellung des lymphatischen Apparates des Darmes. Eine Vermehrung der Bakterien konnten sie nicht nachweisen.

Atlasoff machte im Laboratorium von Metschnikoff während seiner Forschungen über die Virulenzsteigerung des Typhusbacillus die Wahrnehmung, daß denselben die Symbiose mit Bakterien verschiedener Art zu reichlicherer Vermehrung anspornt; am wirksamsten in dieser Hinsicht ist der *Torula rosea* benannte *Saccharomyces*. Derselbe hat sodann die Kaninchen mit Gemengen von Typhusbacillen und dieser *Torula* gefüttert und in den Gedärmen der zugrunde gegangenen Tiere eine Anschwellung des lymphatischen Apparates wahrgenommen.

Auf dieser Spur schritt ich nun weiter; denn es war ersichtlich, daß, wenn diese Ergebnisse der Wirklichkeit entsprechen und die Gärungspilze die Virulenz des Typhusbacillus zu steigern vermögen, jene Pilze angesichts ihrer großen Verbreitung in der Natur bei der Entstehung des Typhus tatsächlich eine Rolle spielen können. Ich hatte vor allen Dingen zu prüfen, ob die Typhusbacillen, mit *Torula rosea* gemengt, bei Tieren wirklich eine dem menschlichen Typhus ähnliche Erkrankung hervorzurufen vermögen. Gelingt dies, so ergibt sich das weitere von selbst. Der normale und krankhafte Darminhalt muß daraufhin geprüft

werden, wie viel Gärungspilze darin vorkommen und welcher Art sie sind, und wenn die im typhösen Darm vorkommende Hefe im Tierversuch die *Torula rosea* zu vertreten vermag, so kann denselben bei der Hervorbringung des Typhus eine Rolle zuerkannt werden.

Vor allen Dingen habe ich untersucht, ob die *Torula rosea* wirklich die Vermehrung des Typhusbacillus im Tierkörper begünstigt und ob die dadurch entstandenen Veränderungen tatsächlich typhöser Natur und nicht einfach Toxinwirkungen sind, wie sie durch die frei werdenden Gifte zugrunde gegangener Bakterien entstehen können.

Bei meinen Versuchen habe ich beständig mit 24-stündigen Agarkulturen von Typhusbacillen, bzw. mit 2—3 Tage alten Kartoffelkulturen von *Torula rosea* gearbeitet, welche ich mit steriler physiologischer Salzlösung abwusch und mit einem weichen Gummikatheter in den Magen der Versuchstiere einführte. Als Versuchstiere dienten mir 4—6 Wochen alte Kaninchen.

Diese Injektion in den Magen wiederholte ich beim ersten Versuch alle 3 Tage, worauf am 20. Tage das Tier einging. Der anatomische Befund, über den ich später sprechen werde, war derart vielversprechend, daß ich nachher den Versuch mit 5 jungen Kaninchen wiederholte. Da der Magensaft auf den Typhusbacillus schädlich einwirkt, so fügte ich dem Kulturgemisch (2 Typhus-, 2 *Saccharomyces*-Kulturen) behufs Neutralisierung der Magensäure stets 10-proz. Natriumbikarbonat zu. Die Dosierung erfolgte in 3-tägigen Zwischenräumen. Während der Dauer des Versuches fiel die allmählich eintretende Schwäche, der Kräfteverfall der Tiere auf. Die Tiere, welche zu Beginn des Versuches sich lebhaft wehrten, reagierten vom 8.—10. Tage ab kaum mehr, sie waren apathisch.

Auffallend war die starke Anschwellung des Unterleibes. Am 16. Tage gingen 2, am 20. und 22. wieder 2 Kaninchen ein. Bei der Sektion der Tiere wurden die Eingeweide mit besonderer Sorgfalt untersucht. In jedem einzelnen Falle nahm ich Impfungen vor aus dem Blute, der Milz, den mesenterialen Lymphdrüsen und aus der Galle.

Der Sektionsbefund war sehr charakteristisch und bei sämtlichen Tieren ziemlich übereinstimmend. Besonders auffallend war bei den Tieren sofort nach Oeffnung der Bauchhöhle die Hyperämie der Gedärme; bei genauerer Prüfung konnte festgestellt werden, daß dies hauptsächlich vom Ileum galt. Bei Untersuchung der Darmschleimhaut war besonders die Veränderung der Peyerschen Plaques ins Auge fallend. Dem ganzen Ileum entlang waren die letzteren in auffallender Weise hervorgetreten und hyperämisch geworden. Bei einigen zeigten sich geringe, mit freiem Auge kaum wahrnehmbare Geschwüre. Aber abgesehen von den Peyerschen Plaques zeigte das Ileum auch in seiner ganzen Länge eine starke Hyperämie, an manchen Stellen auch geringe Blutergüsse. In einzelnen Fällen waren an der beim Eingange des Ileum in den Dickdarm gelegenen großen Peyerschen Plaque die Veränderungen besonders schön wahrzunehmen. In einem Falle waren, dem Colon descendens und sigmoideum entsprechend, an der Darmschleimhaut zwei mächtige hämorrhagische Infiltrationen, etwa in der Größe eines Silberguldens zu sehen.

Auch die Lymphdrüsen wiesen Veränderungen auf. Jede einzelne mesenteriale Drüse war vergrößert, sie vereinten sich zuweilen zu nußgroßen Massen, was bei den sonst ganz winzigen Lymphdrüsen junger Kaninchen schon eine kolossale Vergrößerung bedeutet.

Die Milz war in einzelnen Fällen von übernormaler Größe, zeigte jedoch in dieser Hinsicht keine besonders auffallende Abweichung. Ebenso fand ich auch bei den übrigen Organen keine namhafteren Veränderungen.

In jedem einzelnen Falle war ich bestrebt, aus den Leichen den Typhusbacillus zu isolieren. Letzterer konnte auf Grund seiner biologischen Eigenschaften (auf den üblichen Spezialnährböden) nachgewiesen werden. Am konstantesten gelang es mir, ihn aus der Milz zu züchten, manchmal in Reinkultur, hier und da im Verein mit Coli-Bacillen.

Im Verlaufe der Gewebsuntersuchung der Organe dieser Tiere zeigten die auffallendsten Veränderungen die den Peyerschen Plaques entsprechenden Stellen. Bereits bei schwacher Vergrößerung konnte wahrgenommen werden, daß die Darmschleimhaut stellenweise ganz fehlte und daß selbst die Submucosa freilag. Hier und da breiteten sich diese Geschwüre sehr tief aus, fast bis zur Muskelschicht. An denselben Stellen konnten bei entsprechender Vergrößerung stäbchenförmige Bacillen wahrgenommen werden, welche teils einzeln, teils aber auch in ganzen Scharen dalagen, und zwar nicht nur in den am Darmlumen angrenzenden Schichten, sondern auch im Innern der Schleimhaut bis in die Submucosa. Wo sich die Bakterien in größerer Zahl anhäuften, dort verloren die umgebenden Zellen ihre Färbbarkeit, ihr Kern war blaß und sie machten den Eindruck der Degeneration, bzw. des Absterbens.

In den mesenterialen Lymphdrüsen und in der Milz ergab die Untersuchung des Gewebes eine Vermehrung des lymphoiden und stellenweise eine Wucherung des Bindegewebes.

Durch diese Resultate ermuntert, nahm ich neuerlich 6 Kaninchen in Behandlung und verfuhr mit denselben ganz so wie mit den früheren, bloß mit dem Unterschiede, daß ich die Menge des Typhusbacillus und der Torula zwischen 1—2 Kulturen abänderte, um zu ersehen, ob die Menge des infektiösen Materials auf die Zeitdauer des Verlaufes von Einfluß ist; die Durchführungsweise der Versuche blieb ganz die gleiche wie in den früheren Fällen. Die Dosierung erfolgte in Zwischenräumen von je 3 Tagen. 4 Tiere, welche ich mit der Mischung behandelte, gingen zwischen dem 18. und 30. Tage ein, hingegen 2 Kontrollkaninchen, welche bloß Typhusbacillen erhielten, blieben am Leben. Diese 2 Kaninchen habe ich einige Tage nach dem Tode der anderen seziiert, der Befund war ein vollständig negativer. Am schnellsten ging jenes Tier zugrunde, welches die größte Menge Typhusbacillen und Torula erhielt, am längsten lebte jenes, welches von beiden Stoffen bloß je eine Kultur bekommen hatte. Im allgemeinen hat diese Gruppe das Resultat ergeben, daß auf die Raschheit des letalen Ausganges die Menge der Saccharomyceten von entscheidendem Einfluß ist.

Das allerwichtigste Ergebnis dieser Untersuchungen ist, daß die von mir verwendeten ursprünglichen Typhuskulturen allein in den Nahrungskanal eingeführt nicht imstande waren, die Tiere zu töten. Es sei aber bemerkt, daß schon eine kleine Menge derselben Typhusbacillen, intravenös eingeführt, Kaninchen innerhalb 24 Stunden zu töten vermochte.

Was die bei den eingegangenen Kaninchen vorgefundenen anatomischen Veränderungen betrifft, so waren dieselben mit unwesentlichen Abweichungen ganz die gleichen, wie bei der früheren Versuchsreihe. Am auffallendsten war wieder die Veränderung der Peyerschen Plaques. Die histologische Untersuchung stimmte mit jener der früheren Fälle überein.

Anschließend an diese Untersuchungen prüfte ich während der Be-

handlung der Kaninchen, und zwar zwischen dem 10. und 15. Tage, auch deren Darmentleerung sowie den Urin. Bei den mit der Kulturmischung behandelten Tieren gelang es, den Typhusbacillus zu isolieren; die Prüfung des Urins hingegen ergab ein negatives Resultat. Gleichzeitig prüfte ich das Serum einerseits der bloß mit Typhusbacillen, andererseits der mit einer Mischung des Typhusbacillus mit *Torula rosea* behandelten Tiere auf die Fähigkeit, den Typhusbacillus zu agglutinieren. Das Ergebnis war ein unzweideutiges, indem das Serum der mit Typhusbacillen und *Torula* behandelten Tiere in einer Verdünnung von 1:200 auf den Typhusbacillus agglutinierend einwirkte, dasjenige der nur mit Typhusbacillen behandelten hingegen nicht.

All diese Versuche haben bewiesen, daß beim Zustandekommen der Infektion dem Gärungspilze eine außerordentlich wichtige Rolle zufällt, indem ohne ihn eine Erkrankung der Tiere nicht zustande kommt. Nun bleibt aber noch die Frage offen, worin eigentlich dieser die Infektion befördernde Effekt gelegen ist. Denn entweder üben die *Torula*-Zellen oder deren Produkte auf den Typhusbacillus selbst einen unmittelbaren Einfluß aus, indem sie dessen Verbreitung fördern, oder sie wirken auf die Darmwand des Tieres derart ein, daß sie dieselbe zur Einwanderung und Festsetzung des Typhusbacillus geeignet machen. Die erstere Annahme war schon nach einem einfachen Versuche auszuschließen. Ich bereitete nämlich eine Anzahl Agarkulturen, wovon ich einen Teil mit *Torula rosea* derart besäte, daß ich sie auf der Agaroberfläche reichlich verteilte. Nach einigen Tagen kratzte ich die von *Torula* nun fast schon völlig überdeckte Agaroberfläche mit einer Platinnadel sorgfältig ab und besäte sie sodann mit Typhusbacillen. Gleichzeitig impfte ich auch in ein Kontrollröhrchen (frischer Agar) Typhusbacillen. Wenn nun die *Torula* derart auf den Nährboden einwirkt, daß sie denselben zur Entwicklung der Typhusbacillen geeignet macht, so müßten letztere in den ersten Röhrchen reichlicher wachsen, als auf gewöhnlichem Agar. Dem war aber nicht so. Gleichzeitig untersuchte ich auch, ob die Hefe, auf einem künstlichen Nährboden gezüchtet, durch Veränderung der Eigenschaften des letzteren wohl fähig wäre, Typhusbacillen derart virulent zu machen, daß sie bei Kaninchen den beschriebenen ähnliche Veränderungen hervorrufen könnten. Zu diesem Zwecke züchtete ich *Torula* in Bouillon. So wie ich über eine genügend reiche Kultur verfügte, filtrierte ich dieselbe behufs Entfernung der *Saccharomyces*-Zellen durch ein Berkefeldsches Filter und impfte in das Filtrat Typhusbacillen. Als nach 24 Stunden die Flüssigkeit durch die Bakterien schon gleichmäßig getrübt war, führte ich dieselbe in den Magen eines Kaninchens ein. Es zeigte sich jedoch keinerlei Wirkung. Diese Versuchsreihe gestattet darauf zu folgern, daß die *Torula* die Entwicklung der Typhusbacillen nicht unmittelbar fördert, demnach es wahrscheinlich war, daß sie bloß auf den Darm oder auf den Darminhalt irgendwie einwirkt und nur auf indirektem Wege die Vermehrung des Typhusbacillus fördert. Ich werde darauf übrigens später noch zurückkommen.

Ich habe auch meine Aufmerksamkeit darauf gerichtet, wie lange nach der letzten Injektion der Tod eintritt, was eine Aufklärung darüber bietet, wie lange die Typhusbacillen sich im Organismus vermehren und erhalten können. Es hat sich nun herausgestellt, daß dieser Zeitraum zwischen 3 und 7 Tagen betrug. Der Umstand, daß der Typhusbacillus

auch nach dem Tode herausgezüchtet werden konnte, beweist uns, daß die Typhusbacillen imstande sind, längere Zeit im Organismus zu verharren.

Wenn wir nun die Frage aufstellen, ob die ermittelten Veränderungen den Beobachtungen beim menschlichen Typhus entsprechen, so müssen wir, mit Rücksicht auf die Verwandtschaft des anatomischen Bildes sowie auf den Umstand, daß die Vermehrung der Bakterien nachgewiesen werden konnte, diese Frage bejahen. Sehr wichtig ist, daß aus den Tieren die Typhusbacillen herausgezüchtet werden konnten und daß ihr Blut die Agglutinationsprobe bestand. Die Verschiedenheit zwischen den beiden Krankheitsbildern, namentlich der Umstand, daß die anatomischen Veränderungen sich nicht in so tiefgehenden Geschwüren offenbaren wie beim Menschen, ist bei der Verschiedenheit der beiden Organismen leicht erklärlich.

Nach all dem lag der Gedanke nahe, daß bei der ausgedehnten Verbreitung der Gärungspilze in der Natur derartige Umstände auch beim menschlichen Typhus eine Rolle spielen könnten. Dies konnte mittels Untersuchung einer größeren Anzahl von Stühlen aus Typhuskranken entschieden werden. Ist deren *Saccharomycetengehalt* größer als bei nicht-typhösen, und gelingt es, mit dem darin gefundenen *Saccharomyces* beim Tiere ebensolche Veränderungen zustande zu bringen, wie mit *Torula rosea*, so wird es wahrscheinlich, daß auch beim Zustandekommen der menschlichen Typhusinfektion den Gärungspilzen eine Rolle zukommt.

Zu diesem Zwecke habe ich den *Saccharomyces*-Gehalt der Stühle von 30 Typhuskranken geprüft. Die Untersuchung geschah so, daß ich geringe Mengen der Dejekte auf sterile Kartoffeln übertrug und selbige in mäßiger Stubentemperatur stehen ließ. Dadurch entwickelten die Bakterien sich schlecht, während die *Saccharomyces*-Kolonieen zwischen ihnen mit ihrer weißen Farbe deutlich hervortraten. Das Resultat war ein überraschendes. Während sich bei normalen Darmdejekten Gärungspilze überhaupt nicht oder nur ausnahmsweise (unter 30 normalen Stühlen bei fünf) entwickelten, waren die mit typhösen Dejekten geimpften Kartoffeln von *Saccharomyces*-Kolonieen vollständig überdeckt. Und dies war nahezu jedesmal der Fall. Auffallend war auch die Mannigfaltigkeit der *Saccharomyces*-Arten. Ich konnte im ganzen 4 Arten isolieren, welche entweder einzeln oder nebeneinander vorkamen. Namentlich der von mir im weiteren mit No. 1 bezeichnete war beständig vorhanden.

Hierauf untersuchte ich, ob die aus den typhösen Stühlen herausgezüchteten Hefen fähig sind, die Typhusinfektion beim Kaninchen zu fördern. Zu diesem Zwecke führte ich in den Magen des Kaninchens zweimal Typhusbacillen und Hefe ein. Nach Verlauf von 10 Tagen ging das Kaninchen ein. Die Veränderungen im Darm waren überraschend, indem ich neben einer Anschwellung der Peyerschen Plaques am Coecum eine hämorrhagische Infiltration in der Größe eines Kreuzers und am Sigmadarm eine sich bis zum Mastdarme hinab erstreckende und den gesamten Darmumfang einnehmende Blutung vorfand, auf dem Mastdarme hingegen in der Richtung der Blase eine Perforation, der entsprechend auch die Blase hämorrhagisch infiltriert war; in der Bauchhöhle zeigte sich ein blutig-seröses Exsudat. Typhusbacillen konnten sowohl aus den Dejekten, als auch aus dem Darme, sowie aus der Milz

herausgezüchtet werden. Im vorliegenden Falle trat die Veränderung in den Peyerschen Plaques gegenüber den früheren Veränderungen in den Hintergrund. Man kann daher sehen, daß der aus den typhösen Dejekten herausgezüchtete *Saccharomyces* die Typhusinfektion des Kaninchens noch mehr gefördert hatte als *Torula rosea*.

Diese Resultate, namentlich aber der Umstand, daß in den typhösen Dejekten des Menschen die Gärungspilze konstant und um vieles zahlreicher sind, als in normalen, sowie auch, daß es mit Hilfe derselben möglich ist, auch bei Tieren bedeutende Veränderungen zu bewerkstelligen, haben mich zur Annahme gedrängt, daß auch beim Zustandekommen des menschlichen Typhus ähnliche Umstände mitwirken. Ich fasse die Sache so auf, daß diejenigen, deren Darm eine größere Menge Gärungspilze enthält, zur Typhusinfektion eher disponiert sind als andere, und in dieser Hinsicht verhält sich auch das Kaninchen ähnlich wie der Mensch. Wenn wir in dessen Darms die Gärungspilze ebenfalls in hohem Maße vermehren, so können wir bei demselben ebenso den Typhus zustande bringen, wie er auch beim Menschen erscheint. Es sei nachträglich bemerkt, daß im Kaninchen-darme Hefe kaum vorkommt, und daß jene Gattung, welche, zwar äußerst selten, sich dennoch vorfindet, dem in den typhösen Dejekten des Menschen vorgefundenen nicht entspricht, wo, wie es scheint, besonders die mit No. 1 bezeichnete die charakteristischste ist.

Nach den vorstehenden Ergebnissen erschien es mir lohnend, mich nun ausführlicher mit der Frage zu befassen, welche Rolle bei dieser Steigerung der Virulenz der Hefe zufällt. Ob diese Virulenzsteigerung nicht auch *in vitro* hervorgerufen werden könnte. Ich beschränkte mich bei diesen Versuchen nicht auf den Typhusbacillus allein, sondern dehnte meine Untersuchungen auch auf den ihm verwandten *Coli-Bacillus* aus, und habe namentlich bei der Prüfung der Virulenzveränderungen des letzteren die überraschendsten Resultate gewonnen. Ich muß vorausschicken, daß die jetzt folgenden Ausführungen mich vom Ausgangspunkte eigentlich ein wenig ablenken; da aber deren Substrat, die Virulenzsteigerung des *Coli-Bacillus* *in vitro*, auch über den Mechanismus der Typhusinfektion Licht verbreitet, so schien es mir nicht unangebracht, diese Frage etwas eingehender zu behandeln.

Meine Versuche leitete ich damit ein, daß ich Typhusbacillen mit *Saccharomyces* (No. 1) in Bouillon impfte und eine Woche lang gemeinsam züchtete. Genau in derselben Weise züchtete ich auch *Colibacillen* zusammen mit Hefe No. 1, und nach Verlauf einer Woche isolierte ich den Typhus- bzw. *Colibacillus* aus der Mischkultur und impfte 4 Meerschweinchen, wie folgt:

- |                  |   |
|------------------|---|
| 1) $\frac{1}{2}$ | Agarkultur von Typhusbacillen aus der Mischkultur |
| 2) $\frac{1}{2}$ | " " " des ursprünglichen Stammes                  |
| 3) $\frac{1}{2}$ | " " <i>Colibacillen</i> aus der Mischkultur       |
| 4) $\frac{1}{2}$ | " " " des ursprünglichen Stammes                  |

alle subkutan.

Der Typhusbacillus stammte aus einer alten Laboratoriumskultur, während der *Coli-Bacillus* aus einem Stuhle herausgezüchtet wurde; beide hatte ich mittels sämtlicher Reaktionen identifiziert. Der *Bac. coli* erwies sich für das Meerschweinchen vollkommen avirulent.

Bei den Meerschweinchen 1 und 2 konnte kein Unterschied nachgewiesen werden; beide gingen nach 2 Tagen ein. Um so auffallender

war das Ergebnis bei den mit Coli-Bacillus geimpften Tieren. Während das mit dem ursprünglichen Coli-Bacillus geimpfte Tier am Leben blieb, ging das mit dem aus der Mischung isolierten Coli-Bacillus geimpfte schon nach 16 Stunden zugrunde. Bei der Sektion konnte man eine von der Impfstelle ausgehende, fast das gesamte subkutane Bindegewebe der Bauchwand einnehmende hämorrhagische Infiltration wahrnehmen, in welcher die Coli-Bacillen massenhaft wucherten; im Blute waren mikroskopisch und mittels Züchtungsverfahren gleichfalls Coli-Bacillen nachweisbar.

Dieser Versuch hat somit gezeigt, daß die Hefe 1 *in vitro* die Virulenz des Coli-Bacillus in hohem Maße zu steigern imstande war. Ich wiederholte denselben sogleich bei mehreren Meerschweinchen; das Resultat war jedesmal das gleiche. Nunmehr prüfte ich alle 4 aus den Typhusdejekten herausgezüchteten *Saccharomyces*-Stämme. Jeden einzelnen züchtete ich bei mäßiger Zimmertemperatur in Bouillon zusammen mit Coli-Bacillen, worauf ich die letzteren isolierte und sie Meerschweinchen injizierte. In allen 4 Fällen verendeten die Meerschweinchen nach Verlauf von 24 Stunden. An der Impfstelle befand sich stets eine hämorrhagische Infiltration von der Größe eines Hellers bis zu der eines Fünfkronenstückes, in 2 Fällen ein peritoneales Exsudat, an der Impfstelle und im Blute massenhafte Bakterien. Die auffälligsten Veränderungen zeigten sich in dem Falle des mit dem ersten Stamme zusammen gezüchteten Coli-Bacillus.

Ich führte nachher noch bei mehreren Coli-Bacillenstämmen Versuche nach dieser Richtung hin durch. Mir stand ein alter Laboratoriumstamm zur Verfügung, ferner ein aus Galle und ein aus Darmdejekten herausgezüchteter Coli-Stamm. Jeden einzelnen züchtete ich gemeinsam mit *Saccharomyces* (No. 1), diesmal jedoch nicht in Bouillon, sondern auf einem dem Wachstum von Hefen mehr zusagenden Nährboden, nämlich in Hefewasser. Hefewasser ist nichts anderes als Hefebrühe, der 10 Proz. Rohrzucker beigemengt wurde. Die Kulturen der 3 Coli-Stämme erwiesen sich für Meerschweinchen als vollkommen unschädlich. Nach erfolgter Züchtung in Gemeinschaft mit dem genannten *Saccharomyces* und nach der Isolierung der Coli-Stämme gingen die Tiere bei subkutaner Einführung von 4—6 mg Bakterien zugrunde, und jedes derselben zeigte eine von der Impfstelle ausgehende, bald kleinere, bald größere hämorrhagische Infiltration. Ich muß bemerken, daß ich diesen Versuch sehr oft — wohl 20mal — wiederholte und daß derselbe jedesmal gleich ausfiel. Die Virulenz des Coli-Bacillus nahm *in vitro* immer in bedeutendem Maße zu. Dabei war nicht nur die erste Generation virulent, sondern auch die 6. und 7., und erst nach Verlauf von 10—14 Tagen begann die Virulenz wieder abzunehmen. In der Morphologie des mit dem Gärungspilze zusammen gezüchteten Coli-Bacillus war keinerlei Veränderung wahrzunehmen. Hingegen war die Gasbildung aus Traubenzucker in 24 Stunden zweimal stärker als beim ursprünglichen Stamm, auch die Säure-, Kreatinin- und Indolbildung war gesteigert.

Nach all dem erschien es mir von Interesse, der Frage näher zu treten, was es eigentlich ist, was beim virulenten Coli-Bacillus in Wirksamkeit tritt, dem normalen Bacillus dagegen abgeht, und ob man es hier nicht mit einem Stoffe zu tun hat, welcher auch *in vitro* isoliert werden kann, namentlich, ob hier nicht etwa ein im Bakteriumkörper vorhandenes oder aus demselben ausgeschiedenes Gift mitwirkt, welches



die geschilderten Veränderungen verursacht. Zu diesem Zwecke setzte ich die abgewaschenen Agarkulturen von Coli-Bakterien 3 Tage lang in physiologischer Kochsalzlösung bei 37° der Autolyse aus und entfernte sodann die Bakterienkörper mittels Berkefeldschen Filters. Solche Filtrate bereitete ich aus normalen, wie auch aus virulent gemachten Coli-Kulturen und führte dieselben subkutan, intravenös, sowie auch in die Bauchhöhle von Meerschweinchen ein. Die Filtrate erwiesen sich jedoch selbst in großen Dosen als unschädlich.

Ganz anders jedoch gestalteten sich die Verhältnisse, sobald ich das aus virulenten Bakterien bereitete Filtrat zusammen mit einer kleinen Menge normaler (nicht virulenter) Coli-Bacillen Meerschweinchen injizierte. Eine Gabe von 2 mg normaler Kultur gemeinsam mit 20 cg Filtrat genügte, um schon nach Verlauf von 20 Stunden den Tod des Tieres herbeizuführen. Auch fanden sich an der Impfstelle genau dieselben Veränderungen vor, wie bei den mit virulenten Coli-Bacillen geimpften Tieren, nämlich eine ausgebreitete hämorrhagische Infiltration. Bei dieser gleichzeitigen Dosierung ließ sich die Menge der Coli-Bacillen bis auf  $\frac{1}{4}$  mg herabsetzen, diejenige des Filtrats hingegen auf 10 cg und, wie wir sehen, sogar um vieles darunter, das Resultat war das gleiche, höchstens mit dem Unterschiede, daß das Tier erst in 48 Stunden einging. Gleiche Resultate erzielte ich auch, wenn ich statt des oben erwähnten Filtrates jenes einer 8-tägigen Bouillonkultur von virulenten Coli-Bacillen verwendete. Gerade nur die Dosen mußten in diesen Fällen etwas größer sein. In derselben Weise bereitete ich auch Filtrate aus normalen Coli-Bacillen. Dasselbe hatte jedoch nur in viel größeren Dosen eine die Infektion begünstigende Wirkung auf den Coli-Bacillus. Die kleinste Dosis von letzterem betrug 2 ccm, während die kleinste wirksame Dosis des Filtrates aus virulentem Coli-Bacillus unter 1 cg blieb.

Bemerkenswert war die Wirkung des Filtrates aus virulenten Coli-Bacillen auf den Typhusbacillus; in einer ebenso kleinen Gabe, wie beim Coli-Bacillus, wurde schon  $\frac{1}{100}$  der Dosis letalis des Typhusbacillus für Meerschweinchen todbringend. Bei meinen späteren Versuchen arbeitete ich beständig mit dem Autolysat.

Die Filtrate der normalen und virulenten Coli-Bacillen weichen demnach in ihrer Wirkung wesentlich voneinander ab. Wie wir sehen werden, vermindert das Filtrat der virulenten Coli-Bacillen beim Meerschweinchen die Bakterienaufnahmefähigkeit der weißen Blutkörperchen; hingegen ist das Filtrat des normalen Bacillus dessen nicht fähig. Dasjenige der virulenten Bacillen wirkt schon in sehr geringen Mengen, während die Wirkung des Filtrats der normalen Bakterien schon an ziemlich große Dosen gebunden ist.

Das Filtrat der virulenten Bakterien verliert bei 60° seine Wirksamkeit. Außerdem ist, wie wir später sehen werden, die Wirkung des Filtrats der virulenten Bakterien eine ziemlich spezifische. Alles zusammengefaßt, unterscheidet sich das Filtrat der normalen Coli-Bacillen in gar nichts von Extrakten beliebiger Bakterienarten, deren die Bakterienvermehrung befördernde Eigenschaft nicht spezifisch ist, denn Grawitz und de Bary zeigten, daß avirulente Eiterkokken sowohl durch die eigenen, wie auch durch fremde Bakterienprodukte infektiös werden können. Es ist bekannt, daß Bakterienprodukte fähig sind, eine subletale Dosis von Bakterien derselben Art zu einer letalen Dosis zu ergänzen. Diese Bakterienprodukte paralysieren wohl die Schutzmittel

des Organismus und ermöglichen dadurch den Bakterien ihre Vermehrung. Anders verhält es sich jedoch bei dem Filtrate von mittels Gärungspilzen virulent gemachten Coli-Bakterien. In diesem Falle handelt es sich um einen solchen Stoff, welcher selbst in außerordentlich kleinen Mengen (einige Milligramm) noch ebenso wirkt, wie in großen Dosen. Außerdem charakterisiert er sich durch seine Thermolabilität. Wichtig ist auch, daß er, wie es scheint, eine ziemliche Spezifität besitzt, da er subkutane Dosen des Streptococcus, Anthraxbacillus und Vibrio Metschnikoffi nicht letal gestalten konnte, während wir wissen, daß eine solche Wirkung der Bakterienprodukte überhaupt nicht spezifisch ist, wie dies für Milzbrand- und Tuberkuloseagressine durch Sauerbeck gezeigt wurde. Wenn wir uns schließlich fragen, ob das Filtrat der virulenten Coli-Bakterien nicht etwa identisch ist mit den durch Bail aus bakterienhaltigen Exsudaten und durch Wassermann und Citron aus Kulturen hergestellten sogenannten Aggressinen, so will ich nur hervorheben, daß das von mir hergestellte Filtrat thermolabil und ferner schon in so minimalen Mengen wirksam sich zeigte, die bloß einen geringen Bruchteil, ca.  $\frac{1}{100}$ — $\frac{1}{500}$ , der wirksamen Aggressindosen bilden. Von Wichtigkeit ist auch, daß das Filtrat für sich allein selbst in großen Dosen bei Tieren nicht toxisch wirkt, während die Aggressine einen namhaften Giftinhalt haben. Nicht minder wichtig scheint es, daß mit dem Filtrat des virulenten Coli-Bacillus keine Immunität erzeugt werden konnte.

Den Anstoß zum weiteren Studium des Filtrats des virulenten Coli-Bacillus gab mir eine Arbeit von Kantorowicz bezüglich der Antitrypsinproduktion der diversen Bakterien. Aus seinen Untersuchungen geht hervor, daß die Bakterien in ungleichem Maße fähig sind, der Trypsinverdauung Widerstand zu leisten und schreibt dies der Produktion eines die Trypsinwirkung hindernden Stoffes zu.

Es schien mir nun von Interesse, zu untersuchen, ob hinsichtlich der Trypsinproduktion zwischen dem normalen und dem virulenten Coli-Bacillus irgendein Unterschied besteht. Denn wenn es einen solchen gibt, so könnte dies die Erklärung der Filtratwirkung wesentlich erleichtern. Zu meinen Versuchen verwendete ich die Serumplattenmethode. Das von mir benützte Gröblersche Trypsin untersuchte ich vorerst auf seine Wirksamkeit, wobei ich fand, daß es auch noch in einer Verdünnung von 1:10000 Löfflersches Serum löst. Sodann versetzte ich, von der kleinsten noch wirksamen Dosis beginnend, verschiedene Mengen Trypsin mit stets gleichen Mengen Filtrates einerseits vom normalen, andererseits vom virulenten Coli-Bacillus und gab die Gemische auf Serumplatten. Die Platten legte ich auf 24 Stunden in den Thermostaten. Das Ergebnis war, daß, während auf der Trypsinplatte und auf der Platte mit Trypsin + avirulentem Bakterienfiltrat die Verdauung auch bis zu einer  $\frac{1}{10000}$ -fachen Verdünnung des Trypsins ungestört vor sich ging, auf der Platte mit 1 Proz. Trypsin + virulenten Bakterienfiltrat eine Verdauung nicht stattfand. Ich habe den Versuch mehrmals wiederholt, das Ergebnis blieb immer das gleiche. Während das Filtrat des normalen Coli-Bacillus in keinem einzigen Falle die Verdauung verhinderte, geschah dies beim Filtrat des virulenten jedesmal, allerdings den Filtraten gemäß in verschiedenen Maßen, in einzelnen Fällen, namentlich bei den älteren Filtraten, bloß bis zu einer Lösung von 1 Proz. des Trypsins. Es war

auffallend, daß in letzterem Falle das Filtrat sich auch beim Tierversuche von nur geringer Wirkung erwies, wie auch im allgemeinen die anti-tryptische und die Infektion befördernde Wirkung des Filtrats so ziemlich parallel ging.

Ich prüfte, ob die virulenten Bakterien der Trypsinverdauung gegenüber resistenter sind als die normalen und fand, daß dies allerdings der Fall sei. Die Prüfung bestand darin, daß ich in gleiche Mengen einer Trypsinlösung gleichgroße Mengen virulenter bzw. normaler Coli-Bacillen einimpfte. Die Anzahl der Keime war

	bei den virulenten	bei den normalen
Gleich nach der Impfung:	1080	1200
5 Stunden nachher:	876	432

Der virulente war demnach in viel geringerem Maße abgestorben, als der normale. Nach 24 Stunden, als schon angenommen werden konnte, daß die Ferment-Antifermentreaktion schon abgelaufen, zentrifugierte ich beide Lösungen ab und nahm aus denselben Impfungen auf Serumplatten vor. Die Flüssigkeit, in welcher sich der normale Coli-Bacillus befand, löste die Platte, jene von den virulenten dagegen ließ die Platte unversehrt. Es folgt daraus, daß im Filtrat vom virulenten Coli-Bacillus das Trypsin vollkommen gebunden war.

Das Filtrat vom virulenten Coli-Bacillus ist sonach imstande, den avirulenten Coli-Bacillus infektiös zu machen, es ist in sehr kleinen Mengen wirksam, inaktivierbar und von antifermentativer Wirkung; letztere Wirkung geht mit der die Infektion befördernden parallel. Dem zufolge könnte man sich seine Wirkung am einfachsten so vorstellen, daß es, wie das Trypsin, so auch die bakteriziden Stoffe des Körpers zu binden vermag, wodurch dann auch der avirulente Coli-Bacillus sich im Organismus vermehren könne. Dies würde auch den Unterschied zwischen dem virulenten und normalen Coli-Bacillus erklären. Der normale Coli-Bacillus, welcher keinen derartigen antifermentativ wirkenden Stoff in nachweisbarem Maße produziert, geht im Organismus zugrunde.

Ich habe auch die Wirkung des Filtrates auf das Kaninchenserum geprüft, aber irgendwelche auffallende Hemmung der Bakterizidie nicht beobachtet, was dem Umstande zuzuschreiben ist, daß das Kaninchenserum allein auch nur sehr wenig geeignet ist, den Coli-Bacillus zu töten.

Aehnliche Versuche habe ich mit anderen Bakterien wiederholt; denn falls es sich herausstellte, daß zwischen den virulenten und avirulenten Arten der verschiedenen Bakterien in bezug auf die Antifermentproduktion ein konstanter Unterschied gefunden werden kann, so würde diese Tatsache uns der Erklärung der Virulenzveränderungen der Bakterien wesentlich näher bringen. Schon Kantorowicz nimmt an, daß die wichtigste Schutz Einrichtung des Bakteriums gegen den Organismus dessen Antifermentproduktion ist, ja, er wies sogar nach, daß die Baischen Aggressine die Trypsinverdauung einigermaßen hemmen, aber in bezug darauf, wie sich die virulenten und avirulenten Arten ein und desselben Bakteriums in dieser Hinsicht verhalten, wurden noch keine Untersuchungen durchgeführt.

Ich untersuchte nach dieser Richtung hin den Diphtheriebacillus und den Vibrio Metschnikoffi. Diese Untersuchungen habe ich erst in allerjüngster Zeit vorgenommen und entbehren dieselben noch der Vollständigkeit. Ich konnte dessen ungeachtet konstatieren, daß in bezug

auf Antifermentproduktion zwischen den virulenten und avirulenten Stämmen dieser Bakterien ein gewisser Unterschied besteht. Was jedoch die Intensität dieser Wirkung betrifft, so waren die absoluten Werte beständig kleiner als beim virulenten Coli-Bacillus. Mehrere Versuche zeigten, daß ein bis zu einer Verdünnung von 1:10000 verdauendes Trypsin mit der gleichen Menge des Filtrates des virulenten Diphtheriebacillus vermenget, nur bis zu einer Verdünnung von 1:500 verdaute, mit dem Filtrate eines nicht toxischen Diphtheriebacillus vermenget, bis 1:1000; also auch der nicht toxische Bacillus hemmte die Verdauung, jedoch nur in geringerem Maße. Beim *Vibrio Metschnikoff* waren die Werte gleich groß. Es stellte sich aber später heraus, daß der avirulente *Vibrio* für das Meerschweinchen nicht vollständig unschädlich war.

Weitere Versuche zielten darauf hin, die Einwirkung der wichtigeren Schutzorgane des Organismus auf den virulenten und avirulenten Coli-Bacillus zu verfolgen, hauptsächlich in bezug darauf, ob das Meerschweinchenserum virulente Coli-Bacillen in geringerem Maße abtötet, als normale; ferner untersuchte ich den Grad der Phagocytose bei den Coli-Bacillen verschiedener Virulenz.

Die Bakterizidie des Meerschweinchensersums untersuchte ich in der gewohnten Weise derart, daß ich gleiche Mengen normale und virulente Bacillen in gleiche Mengen Meerschweinchenserum impfte und in gewissen Zeitintervallen Impfungen auf Agar vollführte. Die gewonnenen Kolonienzahlen wichen jedoch nicht wesentlich voneinander ab.

Bestimmtere Resultate lieferte die Untersuchung der Phagocytose, welche ich teils an Material vom Meerschweinchen selbst, teils in vitro mittels der gewohnten Opsoninbestimmungsmethode ausführte. Erstere geschah derart, daß ich am Schenkel von 3 Meerschweinchen kleine subkutane Taschen herstellte und den Stoff mit sterilem Seidenfaden in dieselben einführte. Ich arbeitete parallel mit 3 Meerschweinchen. Das erste bekam normalen Coli-Bacillus, das zweite virulenten, das dritte normalen + Filtrat aus einer virulenten Kultur. Sodann entnahm ich den Taschen stündlich je einen Faden. In der 5. Stunde, als schon ein deutlicher Unterschied bemerkbar war, zählte ich die phagocytierten Bakterien. Das Resultat stimmte bei mehreren Versuchen überein. Am intensivsten phagocytiert war der normale Coli-Bacillus, am wenigsten der virulente. Ebenso war der mit dem Filtrate gemeinsam eingeführte normale Coli-Bacillus von den Leukocyten minder zahlreich aufgenommen worden. Die Unterschiede sind nicht immer sehr groß, aber so ziemlich beständig, in einigen Fällen sogar nicht unbeträchtlich.

Es befanden sich beispielsweise in 50 Leukocyten:

	Normaler Bac.	Virulenter Bac.	Normaler Bac. + virul. Filtrat
1. Versuch	250	64	80
2. "	210	90	70
3. "	171	103	61

Beim Opsoninversuch in vitro vermengete ich:

1) Normale Coli-Bacillen + Meersch.-Serum + Meersch.-Leukocyten					
2) Virulente "	+	"	+	"	
3) Normale "	+	"	+	"	+ virul. Filtrat

Nach 1 Stunde waren in 40 Leukocyten:

Normaler Bac.	Virulenter Bac.	Normaler Bac. + virul. Filtrat
58	35	28

Diese Resultate zeigten, daß der virulente Coli-Bacillus von den Zellen in viel geringerem Maße aufgenommen wird, als der normale, und so gewann ich jedenfalls einen Einblick

in den Mechanismus, der beim Fernhalten der Bakterien seitens des Organismus eine Rolle spielt und dessen Wesen wahrscheinlich darin liegt, daß die Freßtätigkeit der Leukocyten durch die Produkte des virulenten Coli-Bacillus gehemmt wird.

Daß ich die mit dem Coli-Bacillus ausgeführten Versuche so weitläufig behandelte und mich dadurch vom eigentlichen Ausgangspunkt meiner Abhandlung entfernte, sei damit motiviert, daß einesteils die durch *Saccharomyces* hervorgerufene Virulenzsteigerung dieses Bakteriums *in vitro* erreichbar und einer genaueren Untersuchung zugänglich war; andererseits aber ist es nicht unwahrscheinlich, daß die Virulenz des Coli-Bacillus auch im Darmkanale solchen Einflüssen unterliegt, was beim Zustandekommen der Typhusinfektion eine Rolle spielen kann. Denn wird der Coli-Bacillus durch die Symbiose mit Hefen virulenter, so muß dies auch im Darmkanal der Fall sein und es ist nach dem Gesagten leicht verständlich, daß dies besonders im typhösen Darne der Fall sein muß, wo die Zahl der Gärungspilze außerordentlich groß ist.

Mit meinen Beobachtungen stimmt auch die Beobachtung ganz überein, welche Dreifuss in bezug auf die Coli-Bacillen machte. Dreifuss hat nämlich beobachtet, daß die Virulenz des Coli-Bacillus im kranken Darne immer höher ist als im gesunden und daß dieselbe mit der Stärke der Darmaffektion parallel geht. Neisser fand, daß in typhösen Därmen die Virulenz des Coli-Bacillus immer um vieles höher ist, als im gewöhnlichen. Meinen eigenen Versuchen zufolge ist dies leicht verständlich, weil beim Typhus der Gehalt an Gärungspilzen außerordentlich groß ist.

Dies, sowie was ich früher von der Antitrypsinproduktion des virulenten Coli-Bacillus sagte, berücksichtigend, mag dem Coli-Bacillus beim Zustandekommen der Typhusinfektion eine wesentliche Rolle zufallen. Zur Erläuterung des Zustandekommens der Infektion ist es noch nötig, zu wissen, daß das Trypsin den Typhusbacillus intensiv abtötet, wovon auch ich mich mehrfach überzeugen konnte. Der Typhusbacillus ist gegenüber dem Trypsin nur sehr wenig resistent. Man kann sich den ganzen Infektionsverlauf beim Typhus folgendermaßen vorstellen: Durch Einverleibung einer größeren Menge von Gärungspilzen steigert sich die Virulenz der im Darne befindlichen Colibacillen, und dies bedeutet, daß sie eine große Menge des trypsinfeindlichen Stoffes produzieren. Wenn wir nun berücksichtigen, daß ein Drittel der Trockensubstanz des Darminhaltes aus Bakterien, größtenteils aus Colibacillen besteht, so dürfte diese Antifermentproduktion eine außerordentlich lebhafte sein und kann sie die im Darne vor sich gehenden Fermentwirkungen in hohem Maße beeinflussen. Wenn wir nun annehmen, daß die Antifermentproduktion so groß ist, daß sie das Trypsin im Darne vollkommen paralysiert, so hat der Darm seine mächtigste Schutzwaffe gegenüber dem allenfalls anwesenden Typhusbacillus verloren und so wird der letztere infektiös. Eine große Stütze findet diese Annahme darin, daß, wie ich schon früher erwähnte, das Filtrat des virulenten Coli-Bacillus beim Tierversuche auch die Vermehrung des Typhusbacillus begünstigt. Der Coli-Bacillus wird also unter der Einwirkung der Gärungspilze zum Hilfsgefährten des Typhusbacillus. Trifft dieser Vernunftschluß zu, so geht notwendigerweise die Möglichkeit eines neuen wichtigen Versuches

daraus hervor. Es liegt nämlich der Gedanke nahe, daß, wenn das Trypsin und überhaupt die proteolytischen Fermente des Darmes es sind, welche die Typhusinfektion verhindern und wenn das Coli-Antitrypsin es ist, welches dieselbe möglich macht, dann müßte, wenn ich eine genügend große Menge Trypsin künstlich in den Darmkanal einführe, um das Antiferment zu überkompensieren, der ursprüngliche Zustand wiederhergestellt werden, mithin der Typhusbacillus zugrunde gehen, die Infektion verhindert werden.

Um diesbezüglich Klarheit zu schaffen, behandelte ich 10 Kaninchen mit Gemengen von Gärungspilzen in derselben Weise, wie ich es zu Beginn dieser Arbeit schilderte. Sämtliche Kaninchen erhielten in Zeiträumen von 3 Tagen zweimal je eine halbe Kultur Typhusbacillen + 1 Hefekultur. Vom 4. Tage an erhielt die eine Gruppe (6 Kaninchen) täglich je 0,1 g, behufs Neutralisierung der Magensäure mit 10-proz.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung stark alkalisiertes Trypsin. Am 9. und 10. Tage gingen die Kaninchen der zweiten, mit Trypsin nicht behandelten Gruppe (4 Stück) zugrunde, während die mit Trypsin behandelten am Leben blieben und keinerlei Krankheitssymptome zeigten; dagegen gingen mir bei gleicher Behandlung, aber ohne Trypsin, alle Kaninchen ohne Ausnahme (im ganzen 24) ein. Daß diese Kaninchen am Leben blieben, muß demnach lediglich der Einwirkung des Trypsins zugeschrieben werden. Abgesehen davon, daß das Gelingen dieses Versuches die Richtigkeit meiner früher erwähnten Konklusion unter allen Umständen unterstützt, weist es uns außerdem eine Methode an, welche auch bei der Behandlung des Typhus beim Menschen ohne Gefahr und vielleicht auch nicht aussichtslos versucht werden kann. Ich komme nunmehr auf meine früheren Ausführungen zurück.

Was die Steigerung der Virulenz des Coli-Bacillus unter dem Einflusse der Gärungspilze betrifft, so erfordert die Klarstellung dieses Vorganges noch so manche Versuche. Man muß sich denselben wohl so vorstellen, daß der Coli-Bacillus unter der Einwirkung der Gärungspilze jenen Stoff in erhöhtem Maße produziert, welchen ich als Kulturfiltrat untersucht und beschrieben habe. Dieser Stoff ermöglicht die Vermehrung des Coli-Bacillus sowie auch diejenige des Typhusbacillus im Organismus, wohl hauptsächlich dadurch, daß er die Bakterienaufnahme-fähigkeit der weißen Blutkörperchen im Organismus vermindert. Er ist in den avirulenten Bakterien in nur geringem Maße vorhanden, und deswegen sind letztere unfähig, im Organismus sich zu vermehren.

Die gewöhnlichste Art der Virulenzsteigerung war bisher bekanntlich die Tierpassage, abgesehen von dem noch weniger verlässlichen Vorgehen, welches darin bestand, die Bakterien auf künstlichem Nährboden zu züchten, denen tierische Säfte, z. B. Blut, beigemischt wurden. Zwar ist es bekannt, daß die Virulenz, beispielsweise des *Pneumococcus*, sich steigerte, wenn mit ihm zusammen *Anthraxbacillus* —, oder die Virulenz des *Diphtheriebacillus*, wenn mit ihm zusammen *Streptokokken* verimpft wurden. Aus den Versuchen von Stickdorn wissen wir, daß die Virulenz des *Schweinerotlaufbacillus* bei der Mischinfektion mit Coli-Bacillen erhöht wird. All diese Wirkungen wurden jedoch im Tiere beobachtet, und es konnte nicht entschieden werden, ob hier von einer unmittelbaren Wechselwirkung der beiden Mikroorganismen die Rede ist, oder ob bloß einer dem anderen den Weg ebnete. Die unmittelbare

Wechselwirkung, welche ich zwischen Hefen und dem Coli-Bacillus feststellte, ist für andere Bakterien in bezug auf die Virulenzerhöhung noch nicht erwiesen. Aber jedenfalls zeigen die angeführten Angaben in mancher Hinsicht eine Analogie zu dieser Virulenzerhöhung des Coli-Bacillus, und lassen darauf schließen, daß diese Art der Virulenzsteigerung viel allgemeiner ist und eine viel wichtigere Rolle spielt, als bisher bekannt ist. Dies wiederum bedeutet, daß die Erhaltung bzw. die Erhöhung der Infektiosität der Bakterien nicht unbedingt an den Tierkörper gebunden ist, sondern sie kann auch außerhalb desselben vor sich gehen; jedoch kennt man vorläufig jene Faktoren sehr ungenügend, welche ein Bakterium infektiös zu gestalten vermögen.

Eine wichtige Frage, welche unter anderen durch meine Versuche verständlich wird, ist jene der Inkubationsdauer des Typhus. Es war schwer begreiflich, daß der Typhusbacillus, der zu den schnell wuchernden Bakterien zählt, und sich in Nährböden schon im Laufe eines Tages massenhaft vermehrt, beim Menschen erst eine nach etwa 2 Wochen nach der Infektion sich manifestierende Krankheit zustande bringt. Wenn wir aber annehmen, daß zur Typhusinfektion Saccharomyceten und durch deren Vermittelung die Virulenzsteigerung der Coli-Bacillen nötig sind, so dürfte die lange Inkubation eben jener Zeitraum sein, während dessen die Virulenz des Coli-Bacillus sich in dem Maße steigert, um das Fortkommen des Typhusbacillus im Organismus zu ermöglichen.

#### Zusammenfassung.

1) Bei Kaninchen können durch gleichzeitige Verabreichung von Typhusbacillen und Hefen typhöse Veränderungen hervorgebracht werden; am meisten wirksam war in dieser Beziehung eine aus typhösen Dejekten gezüchtete *Saccharomyces*-Art.

2) Verschiedene Gärungspilze steigern in vitro die Virulenz des Coli-Bacillus in hohem Grade und ändern auch sonst dessen biologische Eigenschaften.

3) Die Virulenzsteigerung des Coli-Bacillus ist durch einen Stoff bedingt, welcher nur durch virulente Coli-Bacillen in höherer Konzentration erzeugt wird, und dessen Wirkung darin besteht, daß er die Vermehrung des Coli-Bacillus im Tierkörper befördert, indem er die Freßtätigkeit der Leukocyten schwächt und möglicherweise noch dadurch, daß er die bakteriziden Stoffe des infizierten Organismus bindet, was durch die antitryptische Wirkung jenes Stoffes wahrscheinlich gemacht wird.

4) Der typhöse Stuhl enthält im Gegensatze zum normalen konstant große Mengen Gärungspilze, und nach den früheren Ausführungen spielen die Saccharomyceten beim Zustandekommen der Typhusinfektion eine wichtige Rolle.

5) Der virulente Coli-Bacillus spielt wahrscheinlich durch seine intensive Antitrypsinproduktion beim Zustandekommen der Typhusinfektion eine wichtige Rolle.

6) Mit Typhusbacillen und Hefe gefütterte Kaninchen sind durch Trypsinbehandlung vom sicheren Typhustode zu retten.

*Nachdruck verboten.*

## Ueber Bakterien der Paratyphusgruppe und ihre Beurteilung vom hygienischen Standpunkt.

[Aus der Untersuchungsstation für animalische Nahrungs- und Genußmittel im Königl. Polizeipräsidium zu Berlin.]

Von Dr. **Kurt Schern**, Leiter der Untersuchungsstation.

### Literatur.

Die einschlägige Literatur enthält viele Angaben über das Vorkommen der Paratyphus- und der Enteritisbakterien (Gärtner) bei gesunden und kranken Menschen und Tieren, sowie auch in der Außenwelt.

Die Untersuchungen über den Paratyphus nahmen ihren Ausgang von Erkrankungen des Menschen, welche nach Genuß von Fleisch auftraten und unter dem Bilde einer Vergiftung verliefen. Die Symptome ähnelten sehr den beim Typhus beobachteten, weshalb Bollinger die Krankheit als Sepsis intestinalis bezeichnete. Bollinger wollte damals schon mit dieser Bezeichnung zum Ausdruck bringen, daß es sich bei der von ihm beobachteten Krankheit um eine bakterielle Infektion, und nicht um eine chemische Vergiftung handelt. Gelegentlich einer Fleischvergiftungsepidemie in Röhrsdorf züchteten Gaffky und Paak aus den Organen der mit dem verdächtigen Fleisch geimpften Versuchstiere ein Bakterium, welches in Kulturen keine hitzebeständigen Gifte bildete, sich aber im übrigen genau so verhielt, wie ein 3 Jahre später von Gärtner bei einer Massenerkrankung nach Fleisch isoliertes Bakterium. Gaffky, Paak und Gärtner nahmen an, daß der Genuß des Fleisches die Ursache der Epidemien gewesen war, weil sowohl aus dem Fleisch als auch aus den erkrankten Personen ein und dieselben Bakterien, welche sich auch im Experiment als pathogen erwiesen, gezüchtet werden konnten. Damit war der Beweis erbracht, daß Fleischvergiftungen hinsichtlich ihrer Aetiologie bakterieller Natur sein können. Die Gaffky-Paakschen und die Gärtnerschen Befunde konnten von anderen Autoren sehr bald bestätigt werden. Man stellte fest, daß sich die bei Fleischvergiftungsepidemien gefundenen ursächlichen Bakterien morphologisch und kulturell gleich verhielten. Daß es unter diesen wieder Gruppen gab, wußte man damals noch nicht. Dies zu beobachten war Durham und de Nobele vorbehalten. Diese Autoren prüften die isolierten Bakterien hinsichtlich ihres agglutinativen Verhaltens gegenüber den Immunsera, welche sie durch Vorbehandlung von Kaninchen mit den betreffenden Bakterienstämmen gewannen. Dabei konnten Unterschiede zwischen den Bakterien festgestellt werden, und zwar ließ sich der längst bekannte *Bacillus enteritidis* Gärtner scharf von einem anderen Fleischvergiftungsbakterium abtrennen. Somit war die grundlegende Differenzierung der damals geprüften Fleischvergiftungsbakterien durch die Agglutination gegeben, welche bis auf den heutigen Tag ihre große Bedeutung beibehalten hat. Schottmüller, und nach ihm Kurth, konnten ebenfalls bei Epidemien nach Fleischgenuß Bakterien isolieren, welche dem *Bacillus enteritidis* Gärtner glichen und so, wie dieser, ein dem Typhus ähnliches Krankheitsbild hervorriefen. Deshalb hat Schottmüller die von ihm beschriebene Krankheit als „Paratyphus“ und



die ursächlichen Bakterien als „Paratyphusbakterien“ bezeichnet. Kayser stellte durch vergleichende kulturelle Untersuchungen fest, daß es wiederum innerhalb der Paratyphusbakterien 2 Gruppen gibt, die er als Paratyphus A und B bezeichnete. Trautmann verglich die bis dahin bekannten Bakterien der Fleischvergiftungsepidemien und kam auf Grund seiner Studien zu dem Schluß, daß sie alle zur Gruppe des *Bacillus paratyphosus* B gehören. Als Untergruppe des *Bacillus paratyphosus* stellte er die Gärtner-Bakterien hin. Uhlenhuth konnte mit Hilfe von Serumreaktionen feststellen, daß es 2 große Gruppen von Fleischvergiftungsbakterien gibt, und zwar unterschied er zwischen der *Bacillus enteritidis*-Gruppe, zu welcher

- 1) *B. enteritidis* Gärtner,
- 2) *B. Moorseele* van Ermengem,
- 3) *B. Gent* van Ermengem,
- 4) *B. Brügge de Nobele*,
- 5) *B. Rumfleth* Fischer,
- 6) *B. Haustedt* Fischer

gehörten, und der *Paratyphus*-Gruppe, zu welcher

- 1) *B. paratyphosus* B Schottmüller,
- 2) *B. Breslau* Flügge-Känsche,
- 3) *B. Meirelbeek* de Nobele,
- 4) *B. Düsseldorf* Trautmann,
- 5) *B. Sirault* van Ermengem,
- 6) *B. Aertryck* de Nobele,
- 7) *B. Neunkirchen v. Drigalski*,
- 8) *B. Greifswald* Uhlenhuth

gehörten.

Von den vorstehend gelegentlich bei Fleischvergiftungsepidemien isolierten Bakterien kannte man nicht den Ursprungsort und ihre Herkunft. Die Bakterien fanden sich teils in dem verdächtigen Fleisch, teils in den erkrankten Personen. Der Paratyphus galt als eine menschliche Krankheit. Darüber, daß Tiere vom Paratyphus befallen wurden, wußte man nichts Bestimmtes. Bekannt war allerdings schon, daß die Fleischvergiftungen namentlich nach dem Genuß von solchem Fleisch entstanden waren, welches von erkrankten und notgeschlachteten Tieren herrührte. Bis in die jüngste Zeit waren weder experimentell bewiesene Tatsachen darüber bekannt, welche Krankheiten der schlachtbaren Haustiere dem Fleische dieser eine solche Beschaffenheit verleihen, daß es nach Genuß die unter dem Namen der Fleischvergiftungen bekannten Epidemien hervorruft. Die allgemeine Erfahrung lehrte, daß auf Grund der einzelnen bei den Fleischvergiftungen gemachten Beobachtungen für die Ursachen dieser Epidemien hauptsächlich folgende Tierkrankheiten in Betracht kommen: Bei Kälbern: Pyoseptikämie (Polyarthritiden usw.), Enteritis haemorrhagica, bei Rindern: Allgemeine Septikämie mit Pleuritis und Peritonitis, namentlich im Anschluß an Gebärmutterleiden und Euterentzündungen, Enteritis septica usw.

Die näheren Umstände, weshalb gerade immer das Fleisch derartig erkrankter Tiere nach Genuß pathogen wirkt, waren wissenschaftlich nicht geklärt und nicht bekannt. Der Zusammenhang, der zwischen den spezifischen Erkrankungen der Schlachttiere und den Fleischvergiftungen bestand, war noch nicht hergestellt, und es hat vieler Jahre bedurft, bis er gefunden wurde.

Die Bakteriologie hat die bestehenden Schwierigkeiten teilweise überwunden, und man kennt heute schon einen großen Teil der Beziehungen, welche zwischen den Krankheiten der Schlachttiere und den Fleisch-

vergiftungen bestehen. Die Arbeiten von Partet, Basenau, Langer, Bugge, Junack, Edenhuizen, Dieudonné, Schmitt, Müller, Franke u. a. haben zum wesentlichen Ziel gehabt, Aufschluß darüber zu erlangen, was für Bakterien im Fleisch notgeschlachteter Tiere vorkommen. Zu einem völlig einwandfreien und stets übereinstimmenden Resultat sind die Autoren nicht gelangt.

In ein neues Stadium gelangte die Paratyphusforschung durch die Ergebnisse der Untersuchungen von Uhlenhuth und seiner Mitarbeiter. Bei einer Erkrankung des Schweines, bei Schweinepest, kommt sehr oft der *Bacillus suipestifer*, der dieselben Eigenschaften besitzt wie der *Bacillus paratyphosus* B, vor. Das häufige Vorkommen dieser Bakterienart gab Veranlassung, den Darminhalt von 600 gesunden Mastschweinen bakteriologisch zu untersuchen. In 8,4 Proz. der Fälle gelang es, aus gesunden Schweinen, in der allgemein bekannten Weise, den *Bacillus suipestifer* zu züchten. Die Autoren nahmen an, daß der normalerweise im Schwein vorkommende Paratyphusbacillus unter der Einwirkung des injizierten Serumfiltrates pestkranker Schweine eine spezifische Anreicherung erfährt und „durch den geschädigten Darm in das Innere des Organismus dringt und wie ein Septikämie erzeugender Mikroorganismus Blut und Organe überschwemmt“. Uhlenhuth und Hübener haben außer dem *Bacillus suipestifer* bei der Schweinepest noch viele andere Bakterien in den Organen der erkrankten Tiere gefunden, wie es von vornherein zu vermuten war. Immer aber wurde in überwiegender Anzahl und in den weitaus meisten Fällen der *Bac. paratyphosus* ermittelt.

Uhlenhuth und Hübener berichteten ferner über Versuche, die sie im Kaiserl. Gesundheitsamt zu Berlin angestellt hatten, und teilten unter anderem mit, daß unter den Kälberruhrbakterien, die man bis dahin meist als zur Coli-Gruppe gehörend auffaßte, auch Paratyphus-B- und Gärtner-Bacillen vorkommen. Damit war bewiesen, daß Bakterien des Paratyphus als Erreger der Kälberruhr in Betracht kommen. Hierdurch war das verworrene Gebiet der Bakteriologie der Kälberruhr weiter geklärt, die Paracolibacillen kennzeichneten sich als identisch mit dem *Bac. enteritidis* Gärtner und ebenso konnten die Pseudocolibacillen als besondere Gruppe von Bakterien fallen gelassen werden. Tietze und Weichel stellten fest, daß von 200 Kälberruhrstämmen 23 zur Enteritidis-Gruppe, 1 zur Paratyphus-B-Gruppe gehörten. Schmitt hat besonders interessante Versuche festgestellt, indem er sich die Frage vorlegte, ob Bakterien schon während des Lebens der kranken Kälber in deren Organen vorhanden sind oder erst in der Agone oder postmortal in diese einwandern. Schmitt erbrachte den Beweis, daß unter anderem auch Paratyphusbacillen im Blute erkrankter Kälber kreisen können. Auch Zeller hat bei der Kälberruhr Paratyphusbakterien gefunden. In analoger Weise ist bei anderen kranken Haustieren nach Paratyphusbakterien gefahndet worden. Fischer und Zwick haben bei eitriger Mastitis, Franke bei Metritis der Kühe Bakterien der Paratyphusgruppe ermittelt. Von Nocard ist bei Papageien, von Tartakowsky bei Sperlingen ein Paratyphusbakterium festgestellt worden. Bei kranken Mäusen hat Löffler und ferner Danysz, bei kranken Ratten haben Issatschenko, Dunbar, Schern, bei kranken Meer-schweinchen Smith, van Ermengem, Neisser, Böhme, Eckersdorff und Dieterlen, bei kranken Katzen hat Mori und bei einem an einer Enteritis gestorbenen Affen haben Trommsdorff und Schern

Bakterien der Paratyphus- bzw. Enteritidis-Gruppe gezüchtet. Aus einem Rind hat Rimpau nach dessen Tode gelegentlich einer Fleischvergiftungsepidemie in St. Johann Gärtner-Bakterien isoliert.

Es soll hier ganz kurz der Befunde gedacht werden, welche man hinsichtlich des Vorkommens der in Rede stehenden Bakteriengruppen beim Menschen und bei gesunden Tieren, wie überhaupt in der Außenwelt erhoben hat.

Die Untersuchungen Conradis, welche das Vorkommen von Paratyphusbakterien bei gesunden Menschen in geradezu klassischer Weise illustrieren, sind gelegentlich von Untersuchungen der Umgebung typhuskranker Personen angestellt worden, und diese systematischen Untersuchungen haben hinsichtlich der Paratyphusfrage besonders wertvolle und interessante Resultate gezeitigt.

Ähnliche Befunde konnten von Küster in Freiburg, von Kayser, Gaetgens, Mathes, Mayer und Rimpau, vor allen Dingen aber auch von Hübener erhoben werden.

Bei 400 gesunden Menschen hat Hübener mit Viereck 13mal, und Marman hat in 56 Stuhlproben gesunder Personen 9mal Bakterien der Paratyphusgruppe gefunden.

Die menschliche Pathologie kennt Krankheiten, bei denen die Paratyphusbakterien gelegentlich vorkommen, so z. B. bei Eiterungen, bei Maltafieber, Masern, Tuberkulose, Scharlach, Pneumonie und vielen anderen. Hübener folgert auch dementsprechend, daß die Paratyphusbacillen ihren Namen mit Unrecht führen. Er sagt ungefähr wörtlich: „Sie vermögen alle möglichen Krankheitsbilder zu verursachen und nur in höchst seltener Weise einmal für einen wirklich typhusähnlichen Krankheitsprozeß die Ursache abzugeben. Der Name wird nicht mehr durch einen anderen zu ersetzen sein, die Vorstellung aber, die wir mit diesem Namen für die menschliche Pathologie verbinden, muß eine andere werden.“

Des Vorkommens von Paratyphusbakterien bei gesunden Tieren ist bereits oben schon insofern gedacht worden, als Uhlenhuth in 8,4 Proz. der von ihm untersuchten gesunden Schweinen Paratyphusbakterien ermitteln konnte. Andrejew untersuchte im Kaiserlichen Gesundheitsamt gesunde Hammel auf Paratyphusbakterien und fand diese bei den Tieren, nachdem Uhlenhuth und Hübener schon vorher ähnliche Befunde bei gesunden Kälbern erhoben hatten. Titze und Weichel fanden im Kot eines gesunden Pferdes, Eckardt im Kot eines gesunden Rindes Bakterien der Paratyphusgruppe.

Ganz besonderer Erwähnung bedarf es hier der sehr interessanten Trautmannschen Befunde. Trautmann ist es gelungen, in sehr vielen Fällen bei gesunden, wilden Ratten Paratyphusbakterien nachzuweisen. Im Serum dieser Tiere konnte der Autor spezifische Immunkörper nachweisen. Diese Tatsachen sind mit Rücksicht auf die Rattenvertilgung durch Bakterien, welche sich der Paratyphusgruppe einreihen, von prinzipieller Bedeutung. Sie konnten von Xyländer im Kaiserlichen Gesundheitsamt gelegentlicher Untersuchungen über den Ratinbacillus, welcher ein *Bacillus enteritidis* Gärtner ist, bestätigt werden.

Bei zahmen Ratten, die zwecks Blutgewinnung getötet waren, hat Schern in der Milz Gärtner-Bacillen gefunden. Derselbe Autor hat nach intraperitonealer Impfung mit Sarkomen seuchenhaft eingegangene Ratten, bei denen das Sarkom noch nicht angegangen war, untersucht, und obwohl aus dem Darminhalt dieser Tiere vor der Impfung ein Bak-

terium der Paratyphusgruppe nicht gezüchtet werden konnte, nach dem Tode der Tiere einen *Bacillus enteritidis* Gärtner isoliert. Die näheren Ursachen dieser eigenartigen Infektion konnten leider nicht geklärt werden.

Auch bei Mäusen, Meerschweinchen und Kaninchen sind Paratyphusbakterien ermittelt worden. Ueber das Vorkommen von Paratyphusbakterien beim gesunden und kranken Menschen und Tier liegen, wie die vorstehenden Ausführungen beweisen, größere Untersuchungen vor.

Die Bakteriologen haben in logischer Konsequenz der Bakterienfunde der in Rede stehenden Gruppe auf die Bedeutung des Nachweises der saprophytischen Existenz von Paratyphusbakterien im Darm gesunder Schlachttiere und in der Außenwelt hingewiesen. Es ist unter den obwaltenden Verhältnissen sehr wahrscheinlich, daß durch Exkremente menschlicher und tierischer Herkunft Brunnenwasserläufe usw. verunreinigt werden, wie dies auch schon tatsächlich von Sternberg und Forster beobachtet worden ist. Rimpau hat in einer Schlammprobe der Moder, eines kleinen Fließchens bei Hagenau, Paratyphusbacillen nachgewiesen. Die Schlammprobe war an einer Stelle entnommen, die sich gegenüber dem Schlachthaus befand. Auch Gaehdgens hat einen derartigen Fall beobachtet. Conradi und Rommler haben Paratyphusbakterien im Eis gefunden. Conradi konnte ferner in der Kuhmilch Bakterien der Paratyphusgruppe feststellen, ebenso Hübener, Curschmann u. a. Von großer Bedeutung sind die Funde von Paratyphusbakterien in rohem Fleisch und Fleischfabrikaten, wie Wurst, Schinken usw. Uhlenhuth und Hübener haben darauf hingewiesen, daß sehr leicht die Fleischwaren Paratyphusbacillen, infolge der ubiquitären Verbreitung dieser bei Schlachttieren, enthalten können. Sie haben Untersuchungen angestellt, nach welchen unter 100 Wurstproben 6mal durch direkte Kultur echte Paratyphus-B-Bakterien ermittelt wurden. Sämtliche Wurstproben hatten eine tadellose Beschaffenheit. Rimpau berichtete gleichzeitig von einem Befunde, den er an einer völlig einwandfreien Wurstprobe erheben konnte. Er fand in dieser Wurst Paratyphusbakterien. Mühlens, Dahm und Fürst haben auch versucht, in Pökelfleisch Paratyphusbakterien nachzuweisen. Ihre Befunde sind jedoch nicht einwandfreie, da der direkte kulturelle Nachweis der Bakterien nicht gelang. Wohl erkrankten die mit dem Pökelfleisch gefütterten Versuchstiere sehr oft. Bei der Auswertung dieser Tatsache ist zu berücksichtigen, daß Mäuse schon an und für sich häufig Bakterien der Paratyphusgruppen in ihrem Inneren beherbergen, welche dann, nach Einwirkung bestimmter Ursachen, in die Organe der Versuchstiere eindringen und diese töten. So wird der Anschein erweckt, als ob die Tiere einer von den aufgenommenen Nahrungsmitteln ausgegangenen Infektion erlegen seien. Buthmann hat, ähnlich wie Hübener, mittels direkter Kultur 100 Wurstproben untersucht und dabei 5mal Bakterien des Paratyphus B gefunden. Gleichartige Befunde an 11 Milzen und 9 Lebern hat Cao erhoben. Er konnte aus diesen Organen 8mal Paratyphusbacillen isolieren. Sehr umfangreiche Untersuchungen in dieser Richtung hat Conradi, teilweise zusammen mit Rommler, angestellt. Sie reicherten die in den zur Untersuchung gelangenden Proben vorhandenen Bakterien mittels 48-stündiger Bebrütung bei 37° C an, nachdem vorher den Untersuchungsobjekten Papajotin zugesetzt war. In 16 Proz. der untersuchten Fälle fanden sie in den Nahrungsmitteln Paratyphusbacillen. Aus 10 Hackfleischproben

haben sie 6mal Paratyphusbacillen isoliert. Allerdings waren die Keime immer nur in spärlicher Anzahl vorhanden, worauf Conradi besonders aufmerksam macht.

In der Außenwelt sind demnach auch schon sehr oft Paratyphusbakterien nachgewiesen worden, jedoch nicht in gleichem Umfange wie bei Menschen und Tieren.

### Eigene Untersuchungen.

Von mir sind Versuche angestellt worden, ob Paratyphusbakterien im Schabefleisch und anderen Nahrungsmitteln, als auch in mit Schweine- und Rinderkot gedüngter Gartenerde vorkommen.

Zunächst sind Schabefleischproben in den Wintermonaten auf das Vorhandensein der Paratyphusbakterien untersucht worden.

Im ganzen sind während dieser Zeit 50 Schabefleischproben (gehacktes Rindfleisch), die aus den verschiedensten Gegenden Berlins stammen, zur Untersuchung gelangt. Kleinere Mengen jeder Fleischprobe sind am Tage des Ankaufes und an den beiden darauffolgenden Tagen in rohem Zustande an je 2 Mäuse verfüttert worden. Die kulturelle Untersuchung des Mastdarmes sowie der Faeces der einzelnen Versuchstiere vor Beginn des Versuches hat immer das Vorhandensein von Coli-Bakterien, niemals das von Fleischvergiftungsbakterien ergeben. Die Versuchstiere sind in Mäusegläsern gehalten worden, die für diese Versuche neu angekauft und demnach wohl noch nie mit Fleischvergiftungsbakterien in Berührung gewesen sind. Der Vorrat der Fleischproben ist in dem beim Ankauf mitgegebenen Umhüllungen während der dreitägigen Versuchsdauer im Eisschrank aufbewahrt worden. Am 3. Tage nach dem Ankauf des Fleisches sind außerdem kleinere Mengen jeder Probe im gekochten Zustand — das Abkochen hat in physiologischer Kochsalzlösung stattgefunden — an je 2 Mäuse, bei denen die vorherige Untersuchung die Abwesenheit von Fleischvergiftungsbakterien ergeben hat, verfüttert worden. Daneben haben die Versuchstiere, um interkurrente Todesfälle, welche bekanntlich nach alleiniger Fleischfütterung bei Mäusen sehr oft auftreten, auszuschalten, in 0,85-proz. NaCl-Lösung gekochtes Brot und gekochte Gerste erhalten.

Die Mäuse sind in sterilisierten Gläsern gehalten worden.

Die Fütterung der Tiere habe ich selbst vorgenommen, nachdem die Hände gründlich gereinigt und desinfiziert worden sind. Eine Laboratoriumsinfektion der Tiere ist somit nach Möglichkeit auszuschließen gewesen.

An den drei Untersuchungstagen sind von jeder Fleischprobe einige Oesen in sterile Bouillon gebracht worden. Diese haben 3–4 Stunden im Brutschrank bei 37° C gestanden, hiernach sind mehrere Oesen der Bouillon auf Drigalski-Conradi-Platten und auf Löffler-Platten ausgestrichen worden.

Durch diesen direkten Kulturversuch haben sich während der Untersuchungszeit im Winter aus den Schabefleischproben Fleischvergiftungsbakterien nicht ermitteln lassen. Zwar sind auf sehr vielen der besäten Platten einzelne Kolonien gewachsen, die anfangs den Verdacht auf das Vorhandensein von Paratyphusbakterien erweckt haben. Aber bei den weiteren eingehenden Untersuchungen der „verdächtigen“ Kolonien hat sich bald ergeben, daß die betreffenden Bakterien sowohl durch ihr agglutinatorisches Verhalten gegen Gärtner- und Paratyphus-B-Serum

als auch durch ihr Verhalten in den einzelnen bunten Nährböden unterschiedlich von den echten Paratyphusbakterien gekennzeichnet gewesen sind.

Von den mit den Proben des rohen Schabefleisches gefütterten Mäusen sind 25, von den mit den gekochten Proben des Schabefleisches gefütterten Mäusen sind 13 nach der Fütterung gestorben. Aus den Organen der mit gekochtem Fleisch gefütterten und danach gestorbenen Mäuse haben sich Paratyphus- oder diesen nahverwandte Bakterien in keinem Fall züchten lassen. Worauf der Tod der Mäuse zurückzuführen ist, kann nicht mit Bestimmtheit gesagt werden. Offenbar sind einzelne Mäuse besonders empfindlich gegen die Fütterung mit Fleisch. Coli- und ähnliche Bakterien haben sich aus den Mäuseleichen dann leicht züchten lassen, wenn diese einige Zeit gelegen hatten. Sind aber die Leichen unmittelbar nach dem Tode zur Obduktion gelangt, so haben sich die Organe als steril erwiesen. Vielleicht schädigen die im Fleisch vorhandenen Fäulnisbakterien und deren Gifte primär den Darm und führen weiterhin zum Tode.

Aus 2 der 25 Mäuse, welche nach der Fütterung von rohem Schabefleisch verendet sind, wurden Gärtner-Bacillen aus Herzblut und Leber gezüchtet. Bei den übrigen 23 Mäusen hat die pathologisch-anatomische und bakteriologische Untersuchung Besonderheiten nicht ergeben. Das Resultat ist dasselbe wie bei den mit gekochtem Fleisch gefütterten und danach gestorbenen Tieren. Der Befund an den beiden Mäusen, die einer Gärtner-Infektion nach der Fütterung mit rohem Schabefleisch zum Opfer gefallen sind, ist insofern besonders interessant, als das verfütterte Fleisch erst nach 3-tägiger Aufbewahrung auf Eis pathogen wirkte. Die Mäuse, die am vorhergehenden Tage (also am 2.) und am vorhergehenden Tage (also am 1.) mit Proben desselben Fleisches gefüttert worden sind, haben keine Krankheitssymptome gezeigt. An keinem der drei Untersuchungstage hat der direkte Kulturversuch die Anwesenheit von Gärtner-Bakterien im verfütterten Fleisch ergeben. Aus dem Darminhalt der 2 Mäuse haben sich nur Coli-Bakterien züchten lassen.

Ob der Tod der Mäuse durch eventuell in dem verfütterten Fleisch vielleicht spärlich vorhandene und durch den Aufenthalt in dem Fleisch etwa pathogen gewordene Gärtner-Bakterien verursacht ist — bekanntlich konnte Trautmann apathogene Bakterien der Gärtner-Gruppe durch Aufenthalt in rohem Rindfleisch pathogen machen — oder ob schon an und für sich in dem Organismus beider Tiere Gärtner-Bakterien vorhanden gewesen sind, oder ob nur ein Tier die Gärtner-Bakterien in sich trug und das andere nachher infizierte, soll dahingestellt bleiben. Jedenfalls muß bei Beurteilung dieses Befundes in Betracht gezogen werden, daß auch Mäuse Träger von Paratyphusbakterien sein können und daß eine bakteriologische Untersuchung des Darminhaltes von Versuchstieren, die hinsichtlich des Nachweises von Paratyphusbakterien negativ verläuft, nicht zu dem Schluß berechtigt, daß in den untersuchten Tieren keine Paratyphusbakterien vorhanden sind; denn trotz des negativen Ausfalles der Untersuchung können sehr wohl die Bakterien im Tier vorhanden sein.

Bei späteren Versuchen der gleichen Art ist niemals mehr der Tierversuch mitherangezogen worden, weil er, wie angedeutet, Täuschungen bedingen kann. Ueberhaupt ist nach unseren Erfahrungen

der Nachweis von Fleischvergiftungsbakterien in Zukunft nur durch den direkten Kulturversuch zu führen, weil die Fütterung von Mäusen und Ratten mit Fleisch schon an und für sich viel Todesfälle unter den Versuchstieren bedingt.

Es sind außerdem normale gesunde weiße Mäuse — im ganzen 32 — durch Halsschnitt entblutet und ihre Organe auf die Anwesenheit von Fleischvergiftungsbakterien durch Ausstriche auf Drigalski-Conradi- und Löffler-Platten untersucht worden. Hierbei hat sich bei keiner Maus ein Bakterium der Paratyphusgruppe nachweisen lassen.

Während der Sommermonate sind ebenfalls 50 Schabefleischproben aus verschiedenen Teilen Berlins und seiner Umgebung zur Untersuchung gekommen. Und zwar ist auf Grund der Erfahrungen, welche bei den Versuchen im Winter gemacht worden sind, nur der direkte Kulturversuch nach mehrstündiger Anreicherung in Bouillon und der Kulturversuch nach Anreicherung mit Papajotin zur Anwendung gekommen.

Von den Schabefleischproben werden einige Oesen voll in Röhrchen mit steriler Bouillon gebracht. Diese wurden 3—4 Stunden bei 37° C gehalten. Hiernach werden von jeder Bouillon mehrere Oesen auf Drigalski-Conradi- und auf Löffler-Platten ausgestrichen.

Gleichzeitig wird mit Proben desselben Fleisches die Anreicherung der Bakterien durch Papajotin nach dem Vorgange von Rommler in folgender Weise vorgenommen: In sterile Petri-Schalen werden einige Messerspitzen voll Papajotin gestreut, hierüber einige Kubikzentimeter steriler 0,85-proz. NaCl-Lösung gegossen. Dann werden die bedeckten Schalen 10 Minuten bei 130° C gehalten. Von jeder Fleischprobe wird so viel in den abgekühlten sterilen Inhalt je einer Schale gebracht, als eine kleine Gabelspitze zu fassen vermag. Das Fleisch wird in der Flüssigkeit gut verteilt, so daß zusammenhängende Massen nicht vorhanden sind. Hiernach werden die Schalen bedeckt 48 Stunden bei 37° C gehalten. Nach dieser Zeit verbreitet der Inhalt der Schalen einen penetranten Geruch und ihr Bakteriengehalt ist ein sehr reicher. Mehrere Oesen der Flüssigkeit werden auf Conradi-Drigalski- und auf Löffler-Platten ausgestrichen.

Es sei erwähnt, daß sämtliche Fleischproben an 3 aufeinanderfolgenden Tagen vom Tage der Ankunft im Laboratorium ab in der beschriebenen Weise, sowohl mit Bouillon- als auch mit der Papajotinanreicherung, untersucht worden sind. Das Fleisch ist während der 3 Tage, an denen die Untersuchung stattgefunden hat, auf Eis in Papierhüllen aufbewahrt worden.

Von den besäten Conradi- und Löffler-Platten sind die einzelnen verdächtigen Kolonien in die bunten Nährböden und auf Schrägagar abgeimpft worden. Die Prüfung mit Gärtner- und Paratyphus-B-Serum hat in besonderen Fällen Aufschluß über das agglutinatorische Verhalten der gezüchteten Bakterien gegen diese Sera gegeben.

Der Kolonien, welche beim Beginn solcher Untersuchungen als verdächtig bezeichnet werden, sind sehr viele. Aber oft zeigen schon die bunten Nährböden an, daß es sich um Fleischvergiftungsbakterien nicht handelt.

Wir bemerken, daß wir zur endgültigen Diagnose eines Bakteriums der Fleischvergiftungsgruppe unbedingt sein Verhalten in **allen** uns für diese Zwecke zur Verfügung stehenden Nährböden prüfen müssen. Der bloße Nachweis, daß sich blauviolette Kolonien auf der Drigalski-

Platte und daß sich Kolonien auf der Löffler-Platte, die diese aufhellen und entfärben, befinden, genügt, auch wenn die Agglutination die Zugehörigkeit der gefundenen Bakterien zur Gruppe der Fleischvergifter ergibt, nicht.

Durch Bouillonanreicherung haben sich nur in einem einzigen Falle in einer Fleischprobe Paratyphus-B-Bakterien ermitteln lassen.

Von diesem Bakterium haben sich an dem Tage, an dem die Fleischprobe zum ersten Male untersucht worden ist, nur 3 kleine Kolonien auf der Drigalski-Platte, am zweiten Untersuchungstage haben sich 8 Kolonien auf der Drigalski- und 2 Kolonien auf der Löffler-Platte, am dritten Untersuchungstage 4 Kolonien auf der Drigalski- und 3 Kolonien auf der Löffler-Platte nachweisen lassen.

Auch durch den Papajotinversuch ist das Vorhandensein von Paratyphus-B-Bakterien in der betreffenden Fleischprobe an allen 3 Untersuchungstagen sichergestellt worden. Jedoch sind nach der Anreicherung mit Papajotin sehr viel mehr Kolonien auf den Platten gewachsen. Es ist hierdurch das Auffinden verdächtiger Kolonien ganz wesentlich erleichtert. Auch hat sich bei den weiteren Untersuchungen gezeigt, daß die Anreicherung der Bakterien in Fleisch durch Papajotin der Anreicherung in gewöhnlicher Bouillon überlegen ist, denn wir haben bei den weiteren Untersuchungen noch an 4 anderen Fleischproben mit Hilfe der Papajotinanreicherung Paratyphus-B-Bakterien an den 3 Untersuchungstagen nachgewiesen, während uns dies aus den Proben desselben Fleisches, deren Bakterien nur in Bouillon angereichert gewesen sind, nicht geglückt ist.

Das Verhalten der isolierten 5 Stämme ist in den bunten Nährböden folgendes (s. Tabelle p. 24–27).

Aus den in der Tabelle verzeichneten Tatsachen ist ersichtlich, daß sich die untersuchten Bakterien in kultureller Beziehung mit ganz geringen Abweichungen, denen eine Beachtung wohl nicht zu schenken ist, wie echte Paratyphus- oder auch wie echte Gärtner-Bakterien verhalten.

Anschließend an diese Versuche ist mit Rücksicht auf die früher von mir erhobenen Befunde über das Verhalten des *Bacillus paratyphosus* B und des *Bacillus enteritidis* Gärtner in Arabinose- und Xylose-Lackmusbouillon festgestellt worden, wie sich in den beiden eben genannten Nährmedien die 5 aus Schabefleisch gezüchteten Stämme verhalten:

Befund nach 24-stündiger Bebrütung.			Befund nach 48- u. 72-stünd. Bebrütung.		
Bezeichnung der Kultur	Arabinose-Lackmusbouillon	Xylose-Lackmusbouillon	Bezeichnung der Kultur	Arabinose-Lackmusbouillon	Xylose-Lackmusbouillon
No. IV	rot	hellrosa	No. IV	rot	hellrot
" 7	hellrot		" 7	entfärbt	entfärbt
" 12	"	entfärbt (gelb)	" 12	entfärbt,	"
" 16	"	dgl.		obere Schicht	
" 18	leicht violett	"	" 16	violett	
			" 18	dgl.	"
				"	"

Nach dieser letzten Befundaufnahme werden die Kulturen noch mehrere Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen, ohne daß eine Veränderung gegenüber dem letztmalig nach der Bebrütung erhobenen Befund festgestellt werden kann.



Dauer der Bebrütung	Kultur	Verhalten				
		Trauben- zucker- bouillon	Milchzucker- bouillon	Barsi- kow I	Barsikow II	Löffler I
24 Stunden	Druse (Para- typhus B) (zur Kon- trolle)	stark ver- goren, stark ge- wachsen	kein Gas, gut gewachsen	ausgefällt, rosa	unverändert blau	ausgefällt, oben Schaum, die klare Flüssigkeit etwas ent- färbt
48 „	dgl.	dgl.	Spürchen Gas, sonst unverändert	dgl.	dgl.	dgl.
72 „	„	„	dgl.	„	„	„
96 „	„	„	„	„	„	„
120 „	„	„	„	„	„	„
nach 14-täg. Bebrütung	„	„	„	„	„	„
24 Stunden	Schabefleisch Stamm 18	„	kein Gas, gut gewachsen	„	„	ausgefällt, kein Schaum, die klare übrige Flüssigkeit etwas ent- färbt
48 „	dgl.	„	hat Spürchen Gas gebildet	„	„	dgl.
72 „	„	„	dgl.	„	hat ein feines graues Häut- chen auf der Oberfläche, sonst unver- ändert	„
96 „	„	„	„	„	dgl.	„
120 „	„	„	„	„	„	„
nach 14-täg. Bebrütung	„	„	„	„	„	„
24 Stunden	Schabefleisch Stamm 16	„	kein Gas, gut gewachsen	„	unverändert blau	ausgefällt, kein Schaum, die übrige Flüs- sigkeit etwas entfärbt
48 „	dgl.	„	hat Spürchen Gas gebildet	„	dgl.	dgl.
72 „	„	„	dgl.	„	„	„
96 „	„	„	„	„	„	„
120 „	„	„	„	„	„	„
nach 14-täg. Bebrütung	„	„	„	„	„	„

## in Nährböden

Löffler II	Lackmus- molke	Milch	Orzeinagar	Neutralrot- agar	Hetsch
schwach ent- färbt	rot	nicht geron- nen, unver- ändert	Gasblasen, entfärbt	Gasblasen, entfärbt	ausgefällt, rosa, kein Gas
dgl.	„	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.
„	„	„	„	„	„
entfärbt	wird „ violett bis blau	„	„	„	„
„	blau	peptonisiert	„	„	„
etwas ent- färbt	rot	nicht geron- nen, unver- ändert	Gas, teils entfärbt, teils nicht entfärbt	Gas, teils entfärbt, teils nicht entfärbt	ausgefällt, rosa, Spur Gas
dgl.	„	„	dgl.	dgl.	dgl.
„	blau, mit fei- ner, grauer Haut oben	„	„	„	„
entfärbt	dgl.	„	„	„	„
„	„	peptonisiert	„	„	„
wenig ent- färbt	rot	nicht geron- nen, unver- ändert	„	„	„
dgl.	„	unten Boden- satz weiß, nicht geron- nen, die übrige, oben stehende Flüssigkeit gelblich transparent	„	„	„
„	blau, mit fei- ner, grauer Haut oben	dgl.	„	„	„
entfärbt	dgl.	„	„	„	„
„	„	peptonisiert	„	„	„

Dauer der Bebrütung	Kultur	Verhalten				
		Trauben- zucker- bouillon	Milchzucker- bouillon	Barsi- kow I	Barsikow II	Löffler I
24 Stunden	Schabefleisch Stamm 12	stark ver- goren, stark ge- wachsen	kein Gas, gut gewachsen	ausgefällt, rosa	unverändert blau	ausgefällt, kein Schaum, die übrige Flüs- sigkeit etwas entfärbt dgl.
48 „	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.
72 „	„	„	„	„	„	„
96 „	„	„	„	„	„	„
120 „	„	„	„	„	„	„
nach 14-täg. Bebrütung	„	„	„	„	„	„
24 Stunden	Schabefleisch Stamm 7	„	„	„	„	„
48 „	dgl.	„	„	„	„	„
72 „	„	„	„	„	„	„
96 „	„	„	Spur Gas	„	„	„
120 „	„	„	dgl.	„	„	„
nach 14-täg. Bebrütung	„	„	„	„	„	„
24 Stunden	Schabefleisch Stamm IV	„	kein Gas, gut gewachsen	„	„	„
48 „	dgl.	„	dgl.	„	„	„
72 „	„	„	„	„	„	„
96 „	„	„	„	„	„	„
120 „	„	„	„	„	„	„
nach 14-täg. Bebrütung	„	„	„	„	„	„

Es läßt sich demnach keiner der 5 Stämme in die früher von mir nach dem Verhalten in Arabinose- und Xylose-Lackmusbouillon aufgestellten Gruppen der menschlichen Paratyphusbacillen einreihen. Nur Stamm IV hat etwas Aehnlichkeit mit einem menschlichen Paratyphusstamme, reiht sich aber auch mit Sicherheit in keine der 4 menschlichen Paratyphusgruppen ein.

Die Agglutination der Bakterien ist sowohl mit einem hochwertigen Gärtner- als auch mit einem hochwertigen Paratyphus-B-Serum ausgeführt. Hierbei hat sich der in den folgenden Tabellen verzeichnete Befund erheben lassen.



## in Nährböden

Löffler II	Lackmus- molke	Milch	Orzeinagar	Neutralrot- agar	Hetsch
fast völlig entfärbt	rot	nicht geronnen, unverändert	Gas, teils entfärbt, teils nicht entfärbt	Gas, teils entfärbt, teils nicht entfärbt	ausgefällt, rosa, Spur Gas
völlig ent- färbt dgl.	„ blau, mit fei- ner, grauer Haut oben dgl.	dgl. „	dgl. „	dgl. „	dgl. „
„	„	„	„	„	„
„	„	peptonisiert	„	„	„
„	rot	nicht geronn., unverändert	„	„	„
„	„	„	„	„	„
„	blau, mit fei- ner, grauer Haut oben dgl.	„	„	„	„
„	„	Bodensatz, oben eine schmale, gelb transparente Zone dgl.	„	„	„
„	„	peptonisiert	„	„	„
„	rot	unverändert, nicht ge- ronnen dgl.	„	„	„
„	blau, mit fei- ner, grauer Haut oben dgl.	„	„	„	„
„	„	„	„	„	„
„	„	peptonisiert	„	„	„

## Agglutination der Schabefleischstämmen mit Gärtner-Serum vom Kaninchen.

Titer des Serums 1:10 000.

Stand der Agglutination nach 1/2 Stunde bei 37°.

Kultur	NaCl Kon- trolle	Serumverdünnung							
		1:100	1:200	1:500	1:1000	1:2000	1:3000	1:5000	1:10 000
Gärtner GA.	—	+	+	+	+	+	+	+	+
Schabefl.-St. 18	—	+	—	—	—	—	—	—	—
„ 16	—	±	—	—	—	—	—	—	—
„ 12	—	+	—	—	—	—	—	—	—
„ 7	—	+	—	—	—	—	—	—	—
„ IV	—	+	—	—	—	—	—	—	—

# Agglutination der Schabefleischstämme mit **Paratyphus-B**-Serum vom Kaninchen.

Titer des Serums 1:5000.

Stand der Agglutination nach  $\frac{1}{2}$  Stunde bei 37°.

Kultur	NaCl Kontrolle	Serumverdünnung					
		1:100	1:300	1:500	1:1000	1:3000	1:5000
Runge (Paratyphus B)	—	+	+	+	+	+	±
Schabefleisch St. 18	—	+	—	—	—	—	—
„ „ 16	—	+	—	—	—	—	—
„ „ 12	—	+	—	—	—	—	—
„ „ 7	—	+	—	—	—	—	—
„ „ IV	—	+	—	—	—	—	—

Die Stämme sind dann 24mal auf Agar umgezüchtet worden, aber auch hiernach hat die Agglutination ein anderes Resultat nicht ergeben.

Demnach wären die Bakterien weder zur Paratyphus- noch zur Gärtner-Gruppe zu zählen.

Es ist mit dem Stamm 18 zunächst ein Kaninchen immunisiert worden. Das Serum dieses Kaninchen agglutiniert den Schabefleischstamm bis zur Verdünnung 1:8000. Mit diesem Serum sind auch die anderen Schabefleischbakterienstämme agglutiniert worden, wie aus der nachstehenden Tabelle ersichtlich ist.

Verdünnung des Kaninchenserums Stamm 18	Bakterienstamm No.				
	18	16	12	7	IV
1:1000	+	+	+	+	+
1:3000	+	+	+	+	+
1:5000	+	+	±	+	+
1:8000	+	—	—	+	—
Kontrolle mit Normalkaninchen-serum, Verdünnung 1:1000	—	—	—	—	—
Kontrolle in 0,85-proz. NaCl-Lösung	—	—	—	—	—

Demnach verhalten sich alle die aus den Schabefleischproben gezüchteten Bakterien dem Serum des mit Stamm 18 immunisierten Kaninchens gegenüber gleich. Die Stämme sind also in dieser agglutinativen Hinsicht untereinander identisch.

Mit demselben Serum (Kaninchen Stamm 18) ist ein Paratyphus-B-Stamm (Runge) und ein Gärtner-Stamm (Gärtner G. A.) agglutiniert worden. Diese beiden Bakterienstämme haben sich von ihren zugehörigen Sera bis zur Titergrenze (1:5000 und 1:8000) agglutinieren lassen. Das Nähere ist aus der folgenden Tabelle ersichtlich.

Verdünnung des Kaninchenserums Stamm 18	Bacillus paratyphosus B (Runge)	Bacillus enteritidis Gärtner (G. A.)
1:1000	+	—
1:3000	+	—
1:5000	+	—
1:6000	+	—
1:7000	±	—
1:8000	—	—
Kontrolle: Normales Kaninchenserum, Verdünnung 1:1000	—	—
Kontrolle in 0,85-proz. NaCl-Lösung	—	—

Da sich der Paratyphus-B-Stamm (Runge) und der Gärtner-Stamm (G. A.) von ihren eigenen Sera, wie aus den beiden ersten Tabellen ersichtlich, bis zur Titergrenze agglutinieren lassen und das Kaninchenserum Stamm 18 denselben Paratyphusstamm bis fast zur Titergrenze agglutiniert, so ist anzunehmen, daß der Schabefleischbakterienstamm 18 und die anderen mit ihm identischen, aus dem Schabefleisch gezüchteten Bakterienstämme zur Paratyphus-B-Gruppe gehören, obgleich sie sich von dem in dem vorstehenden Versuche verwendeten Paratyphus-B-Serum nicht agglutinieren lassen. Leider war es mir nicht möglich, die Schabefleischstämme noch mit anderen Paratyphus-B-Sera zu agglutinieren.

Die von mir gezüchteten Bakterien färben sich mit den gebräuchlichsten Farbstoffen leicht, nach Gram entfärben sie sich.

Die Schabefleischstämme sind auf ihr pathogenes Verhalten Mäusen gegenüber geprüft worden. Es werden 24-stündige Agarkulturen der 5 Stämme mit je etwas 0,85-proz. NaCl-Lösung abgeschwemmt und je eine Abschwemmung wurde auf kleine Mengen Brot, die sich in je einer Glasschale befinden, ausgegossen. Mit je einer Abschwemmung wurden in dieser Weise 3 Mäuse gefüttert. Die Mäuse blieben dauernd leben.

Außerdem werden von jedem einzelnen Bakterienstamm je 2 Mäuse infiziert mit einer  $\frac{1}{10}$  und 1 Oese der Kultur. Die Tiere bleiben mit Ausnahme einer Maus, welche interkurrent stirbt, sämtlich am Leben.

Auch sind die 5 Schabefleischstämme auf Toxinbildung geprüft worden. 4 Wochen alte Bouillonkulturen der 5 Stämme werden durch Berkefeld-Kerzen so oft filtriert, bis das Filtrat nach 4-tägigem Aufenthalt bei 37° steril bleibt.

Von den 5 rohen Filtraten werden je 2 ccm je einem Meerschweinchen subkutan injiziert. Zwei Meerschweinchen, von denen das eine mit Filtrat des Schabefleischstammes 18, das andere mit Filtrat des Stammes No. IV gespritzt worden sind, bleiben am Leben. Dagegen sind die 3 Meerschweinchen, von denen

das erste	mit Filtrat vom Stamm	16,
„ zweite	„ „ „	12,
„ dritte	„ „ „	7

gespritzt worden sind, einen Tag nach der Injektion tot. An den großen Organen dieser Tiere lassen sich Besonderheiten nicht nachweisen, dagegen sind die Nebennieren gerötet. Die aus den Organen angelegten Kulturen bleiben steril.

Demnach haben Stamm 16, 12 und 7 Toxine gebildet.

Die Hitzebeständigkeit dieser Toxine wird so geprüft, daß drei Reagensröhrchen mit je einem der Filtrate beschickt werden. Die Röhrchen werden in ein kaltes Wasserbad gestellt und dieses bis zum Sieden erhitzt. In dem siedenden Wasser verbleiben die Röhrchen 45 Minuten lang. Hiernach werden sie abgekühlt und je drei Meerschweinchen erhalten je 2 ccm von dem Filtrate subkutan. Die Tiere, die mit den gekochten Filtraten der Stämme 16 und 7 gespritzt worden sind, bleiben am Leben, wohingegen das Meerschweinchen, welches 2 ccm des erhitzten Filtrates von Stamm 12 erhalten hat, einen Tag nach der Injektion tot ist. Die großen Organe dieses Tieres weisen bei der Obduktion Besonderheiten nicht auf und die von ihnen angelegten Kulturen bleiben steril. Nur die Nebennieren sind rot. Demnach ist

anzunehmen, daß der Schabefleischstamm 12 hitzebeständiges Toxin gebildet hat. Im Anschluß an diese Versuche sind 2 Proben Rehfleisch, 1 Probe Wildschweinfleisch und 1 Probe Fleisch von einem Wildkaninchen nach Anreicherung in Bouillon und Papajotin auf das Vorhandensein von Paratyphusbakterien untersucht worden. Außerdem werden 42 Proben von Erdbeeren, Kohlrabi, Mohrrüben und Kohl, die in einem mit Kot von schweren schweinepestkranken Tieren gedüngten Garten gewachsen sind, sowie auch 10 Proben von Erde dieses Gartens auf Paratyphusbakterien untersucht. Zwar findet man beim Beginn solcher Untersuchungen oft Kolonien, die zunächst den Verdacht erwecken, daß sie zur Fleischvergiftergruppe gehören. Aber bei der weiteren Untersuchung ergibt sich, daß diese Bakterien unterschiedlich von der Paratyphusgruppe gekennzeichnet sind. In keiner der genannten Proben haben sich Paratyphusbakterien ermitteln lassen.

Ebensowenig habe ich in 45 Proben von weißem Käse und in 20 Proben von Butter Bakterien der Paratyphusgruppe nachweisen können.

Nicht unerwähnt soll bleiben, daß sich bei der Untersuchung von Ausstrichen aus dem Mastdarm von 8 lebenden Enten und 3 lebenden Gänsen auf Drigalski- und Löffler-Platten jedesmal in sehr großer Anzahl Bakterien gezeigt haben, die paratyphusähnlich gewachsen sind und leicht zu Täuschungen Veranlassung geben. Auch hier verschafft die weitere Untersuchung sehr bald Gewißheit darüber, daß man es nicht mit Paratyphusbakterien zu tun hat.

Von Interesse ist es, mit Rücksicht auf die Versuche, welche kürzlich Conradi, L. Meyer und Rommeler über die Einwanderung von Paratyphusbakterien in die Tiefe von Fleisch angestellt haben, zu erfahren, ob die Bakterien der Paratyphusgruppe durch die äußere Umhüllung von Wurst und „amerikanischen Blasenschinken“ in das Innere dieser Nahrungsmittel eindringen.

Bekanntlich haben Conradi, L. Meyer und Rommeler festgestellt, daß die Bakterien des Paratyphus in frisches Schlachtfleisch, das bei gewöhnlicher Zimmertemperatur 24—48 Stunden aufgehoben wurde, bis in eine maximale Tiefe von 11—14 cm hineinwuchern können.

Für die nachstehenden Versuche wurde Leberwurst, Mettwurst, Landleberwurst, frische Blutwurst und Blasenschinken verwendet. Auf eine mit Blaustift umränderte kleine Partie der äußeren Hüllen dieser Fleischprodukte wird je 1 Oese einer 24-stündigen Bouillonkultur von Paratyphus B (Runge) verrieben. Die Wurststücke und das Schinkenstück sind nur so groß, daß man bequem von der Seite her mit einer ausgeglühten Platinöse unter die beimpfte Partie in beliebiger Entfernung von dieser Material zur weiteren bakteriologischen Verarbeitung entnehmen kann. In den Schinken waren zwecks späterer Materialentnahmen unterhalb der zu beimpfenden Partie Schnitte durch das Fleisch angelegt. Die Fleischwaren werden während des Versuches in sterilen Glasschalen gehalten und der Versuch wird im Laboratorium bei Zimmertemperatur ausgeführt. Zur Kontrolle werden gleiche große Stücke derselben Würste unter denselben Bedingungen, aber unbeimpft gehalten.

Die bakteriologische Untersuchung der beimpften als auch der unbeimpften Fleischware geschah in der Weise, daß mehrere Male hintereinander das in der beschriebenen Weise entnommene Material auf je

einer Conradi-Drigalski- und auf einer Löffler-Platte ausgestrichen und je 1 Bouillonröhrchen beimpft wurde. Die Kulturen wurden nach 24-stündiger Bebrütung in der bekannten Weise weiteruntersucht, die verdächtigen Kolonien wurden isoliert und weitergeimpft, von der Bouillonkultur werden Ausstriche auf der Drigalski- und auf der Löffler-Platte angelegt. 1 Stunde, 3 Stunden und 24 Stunden nach Ansetzen des Versuches werden Ausstriche von den beimpften und unbeimpften Wurststücken und von dem beimpften und unbeimpften Schinken angefertigt. Das Material war ungefähr  $\frac{1}{4}$  cm unterhalb der beimpften Stellen der Umhüllungen entnommen.

Die nach 1 Stunde angelegten Kulturausstriche weisen nur Coli-Bakterien auf.

Auf den 3 Stunden nach der Beimpfung angelegten Kulturen sind nach 24-stündiger Bebrütung aus dem Material von der beimpften Leber (No. 1) und Mettwurst (No. 2) und aus dem Material von der unbeimpften Mettwurst (No. 2a) „paratyphusverdächtige“ Kolonien in sehr geringer Zahl angegangen, die übrigen Kulturausstriche wiesen nur Coli-Bakterien auf. Bei der weiteren Verarbeitung der „verdächtigen“ Kolonien von No. 1 stellte sich bald heraus, daß diese nicht zur Paratyphusgruppe gehörten, während die Kolonien aus beimpfter Mettwurst 2 und unbeimpfter Mettwurst 2a auch im weiteren Verfolg paratyphusähnlich wuchsen. Aus echten Paratyphusbakterien sind diese Kulturen nicht zusammengesetzt; denn ihr Verhalten ist in den einzelnen Nährböden ein prinzipiell abweichendes. Außerdem lassen sich die isolierten Bakterien weder vom Paratyphus-B- noch vom Gärtner-Serum noch vom Serum des Kaninchens, welches mit dem obenerwähnten Schabefleischstamm 18 immunisiert worden war, agglutinieren. Ein ähnliches Resultat war bei den Kulturen zu verzeichnen, welche 24 Stunden nach der Beimpfung der Untersuchungsobjekte angelegt wurden. In diesem Falle waren aus der beimpften Leberwurst (No. 1) und aus der beimpften Mettwurst (No. 2) paratyphusverdächtige Kolonien gewachsen, während alle übrigen Kulturen, auch die aus der unbeimpften Mettwurst (No. 2a) angelegten, nur Coli-Bakterien aufwiesen. Bei der weiteren Untersuchung stellte sich heraus, daß die aus Wurst 1 und 2 gezüchteten Bakterien keine echten Paratyphusbakterien waren. In diesem Versuche konnte also ein Eindringen von Paratyphusbakterien durch die Umhüllungen von Würsten und einem Schinken in das Innere nicht beobachtet werden. Demnach kann angenommen werden, daß sich die in der Wurst vorkommenden Paratyphusbakterien primär in dieser vorfinden, eine sekundäre Einwanderung der Bakterien von außen her wird die Ausnahme bilden.

### **Beurteilung paratyphusbacillenhaltiger Nahrungsmittel vom Standpunkt der Hygiene.**

Angesichts der über die Paratyphusbakterien, speziell der über das Vorkommen dieser in der Außenwelt, in Nahrungsmitteln, im Menschen und Tier mitgeteilten Tatsachen, drängt sich uns die Frage auf, wie die Funde von Paratyphusbakterien in Nahrungsmitteln, besonders in Fleischwaren zu beurteilen sind, um Fleischvergiftungen zu verhüten.

Zunächst muß, um diese Frage zu beantworten, betont werden, daß es mit den heutigen kulturellen und biologischen Differenzierungsmethoden nur gelingt, die Paratyphusbakterien von den Gärtner-Bakterien zu trennen. Sichere Unterscheidungsmittel zwischen



den einzelnen Bakterien der Paratyphus-B-Gruppe untereinander und zwischen den Bakterien der Gärtner-Gruppe untereinander fehlen. Man kann also nicht die Paratyphus-Bacillen des Menschen von den Paratyphusbakterien der Kälber, Kühe, Schafe, Pferde, Schweine, Meerschweine, Mäuse, Katzen, Hunde, Papageien, Sperlingen, auch nicht von den saprophytisch in der Außenwelt — Wurst, Fleisch, Eis, Milch usw. — vorkommenden unterscheiden. Ebenso wenig gelingt das hinsichtlich des *Bacillus enteritidis* Gärtner vom Menschen und der Gärtner-Bakterien der Kälber, der Ratten (Rattenschädlinge) usw.

Zwar sind oft Versuche angestellt worden, welche darauf abzielten, Unterschiede zwischen den einzelnen Bakterien der beiden Hauptgruppen untereinander festzustellen. Es erübrigt sich, hier auf die in dieser Richtung angestellten Versuche näher einzugehen. Es sollen nur die an einem sehr umfangreichen Material ausgeführten Versuche von Schern über das Verhalten verschiedener Stämme des *Bacillus paratyphosus* und *Bacillus enteritidis* Gärtner in Arabinose- und Xyloselackmusbouillon, welche veröffentlicht worden sind, deshalb erwähnt werden, weil es diesem Autor bei den von ihm untersuchten Bakterien gelungen ist, festzustellen, daß sich viele — aber nicht alle — der tierischen Paratyphusbacillen anders verhalten, als die menschlichen. Bezüglich eventueller Unterschiede in der Pathogenität für Menschen und Tiere auf Grund dieser kulturellen Unterschiede äußert sich der Autor nicht. Ueberhaupt will er seine Resultate nicht ohne weiteres verallgemeinert wissen und er weist deshalb besonders darauf hin, daß derartige Kulturdifferenzierungsversuche, wenn ein allgemeingültiges Urteil erzielt werden soll, überall an sehr vielen Bakterienstämmen auszuführen sind. Es sind nach Schern mitunter kulturelle Unterschiede zwischen den menschlichen und tierischen Paratyphusbakterien und den Gärtner-Bakterien vorhanden. Praktisch können diese Unterscheidungsmerkmale vorläufig noch nicht verwendet werden. Ebenso verhält es sich mit allen anderen Differenzierungsmethoden der Bakterien einer der beiden Gruppen.

In praktischer Beziehung muß man deshalb, infolge des Mangels geeigneter bakteriologischer Untersuchungsmethoden zu dem Schluß kommen, daß die Bakterien der Paratyphusgruppe gegenseitig nicht unterschieden werden können. Das Gleiche gilt für die Bakterien der Gärtner-Gruppe.

Damit soll nicht ein apodiktisches Urteil gegeben werden, und gesagt sein, daß sich die genannten Bakterien überhaupt niemals für die Praxis unterscheiden lassen. Aber vorläufig haben wir keine Möglichkeit, die Bakterien zu trennen.

Dementsprechend sind auch die Funde von Bakterien der Paratyphusgruppe in der Außenwelt, in Nahrungsmitteln usw. zu beurteilen: Ein Paratyphusbakterium in einem Nahrungs- oder Genußmittel kennzeichnet dieses vom Standpunkt der Hygiene als zum Genuß für Menschen untauglich! Denn wer wollte die Freigabe eines solchen Nahrungsmittels in den Verkehr z. B. vor Gericht als erlaubt und ungefährlich hinstellen, da in Hunderten von Fällen die Erfahrung gelehrt hat, daß tierische Paratyphus- bzw. Gärtnerbakterien die Ursache von Fleischvergiftungen abgegeben haben? An dieser Erfahrungstatsache darf nicht achtlos vorübergegangen werden, wenn vielleicht auch in vielen Fällen ein paratyphusbacillenhaltiges

Fleisch ohne wahrnehmbare Schädigung genossen wird. Ein paratyphusbacillenhaltiges Fleisch braucht nicht eine Fleischvergiftung hervorzurufen, aber es kann dieser Fall eintreten. Hübener sagt in seiner Monographie über Fleischvergiftungen ungefähr: Das Zustandekommen einer Fleischvergiftung ist nicht ein einfacher Vorgang, sondern das Produkt einer Reihe komplizierter Prozesse, bei denen allerdings die spezifischen Bakterien den Hauptanteil haben.“ Diese zweifellos zu Recht bestehende Auffassung Hübeners ist durch Beobachtungen in der Praxis bestätigt. Sie muß deshalb eingehend berücksichtigt werden, und es ist die Frage zu beantworten: Ist derjenige, welcher ein paratyphusbacillenhaltiges Nahrungsmittel unbeanstandet in den Verkehr zum Konsum läßt, in allen Fällen in der Lage, die einzelnen bei der Paratyphuserkrankung der Menschen in Betracht kommenden Umstände im Voraus zu beurteilen? Das ist nicht der Fall, weil der Untersuchende nie weiß, ob das mit Paratyphusbakterien behaftet befundene Nahrungsmittel nicht vielleicht von Menschen genossen werden könnte, bei denen eine Paratyphusinfektion besonders leicht infolge einer intestinalen Indisposition zustande kommt. Ferner ist nicht vor auszusehen, ob nicht das paratyphusbacillenhaltige Fleisch noch vor der Konsumierung einige Tage auf Eis aufbewahrt und hierdurch, wie Trautmann das experimentell bei Gärtnerbakterien festgestellt hat, die vorhandenen Paratyphusbakterien virulenter werden. Sodann kann der Untersuchende nicht wissen, ob das betreffende Nahrungsmittel im gekochten oder rohen Zustande konsumiert wird. Rohes, paratyphusbacillenhaltiges Fleisch ist natürlich gefährlicher, als gekochtes.

Aus dem Gesagten geht demnach zur Genüge deutlich hervor, daß derjenige, welcher ein mit Paratyphusbacillen behaftetes Nahrungsmittel hinsichtlich der Genußtauglichkeit zu beurteilen hat, nur die Tatsache der gefundenen Bakterien bei seinem Urteil in Erwägung ziehen muß.

Die Formel, nach der die Beurteilung paratyphusbacillenhaltigen Fleisches im Sinne der Hygiene und auch nicht zum wenigsten zur persönlichen Sicherheit des Untersuchenden selbst zu erfolgen hätte, würde lauten: Es sind Paratyphusbakterien vorhanden<sup>1)</sup>. Diese können die Erkrankung von Menschen veranlassen. Deshalb ist das mit Paratyphusbacillen behaftete Nahrungsmittel in allen Fällen zu beanstanden. Hauptsächlich werden in dieser Beziehung Nahrungsmittel tierischer Herkunft, wie Fleisch, Wurst, Schinken, Milch usw. in Betracht kommen.

Es ist bei der Frage in theoretischer Beziehung gleichgültig, ob das Fleisch usw. noch zu Lebzeiten des Tieres, von dem es herrührt, infiziert war oder ob es post mortem infiziert worden ist. Zu berücksichtigen ist allerdings, daß auf Grund sehr vieler Erfahrungen das Fleisch intra vitam infizierter Tiere hauptsächlich zu den sogenannten Fleischvergiftungsepidemien Veranlassung gegeben hat. Conradi kann ich nicht darin zustimmen, wenn er sagt, daß die Frage noch offen steht, ob die menschliche Fleischvergiftung auf Tierkrankheiten zurückgeht. Uhlenhuth und seine Mitarbeiter sowie Schmitt haben bereits bewiesen, daß Paratyphusbacillen bei Krankheiten der Kälber, so z. B. bei der Ruhr, der Septikämie und der Lungen-Brustfellentzündung vorkommen. Auch bei der Schweinepest sind die Pestifer- oder Paratyphusbakterien in allen Organen des erkrankten

1) Betreffs des intra vitam und postmortal infizierten Fleische siehe weiter unten.

Organismus nachgewiesen worden. Es ist demnach paratyphusbacillenhaltiges Fleisch in praktischer Hinsicht ganz besonders zu berücksichtigen.

Durch die obigen Ausführungen ist auch zugleich die Beurteilung über das „postmortal“ infizierte Fleisch gegeben. Auch dieses Fleisch ist zu beanstanden.

Besonderer Erwähnung bedarf hierbei das „Hackfleisch“ oder „Schabefleisch“, soweit eine postmortale Infektion oder Anreicherung der Keime in Betracht kommt. Das Fleisch hat vor dem „Hacken“ oder „Schaben“ der Beschau unterlegen und unterliegt keiner weiteren Untersuchung. Durch die mechanische Zerkleinerung werden die Bakterien von der Oberfläche in die Tiefe des Fleisches gebracht und können hier angereichert, gegebenen Falles auch, wie Trautmann bewiesen hat, in ihrer Virulenz gesteigert werden. Auch infiziertes Hackfleisch ist stets zu beanstanden, weil Menschen nach dessen Genuß in ihrer Gesundheit geschädigt werden können. Erfahrungsgemäß spielen ja die „Hackfleischvergiftungsepidemien“ in der Geschichte der Fleischvergiftungen eine besonders große Rolle, und sie haben deshalb so viel zu denken gegeben, weil die Ursache der Infektion des Fleisches mit den Fleischvergiftern nicht immer geklärt werden konnte, namentlich dann, wenn das Fleisch von gesunden Tieren stammte und für genußtauglich erklärt wurde. Diese Fälle sind heute nur so zu erklären, daß eine nachträgliche postmortale Infektion, z. B. durch an Paratyphus usw. leidenden Menschen oder durch tierische oder in der Außenwelt vorkommende saprophytische Paratyphusbakterien stattgefunden hat. Gerade diese Fälle der Praxis weisen daraufhin, daß jedes „Hackfleisch“ oder „Schabefleisch“, welches Paratyphusbakterien enthält, beanstandet werden muß. Dasselbe ist von allen anderen Fleischwaren und Fleischprodukten in dieser Beziehung zu sagen.

Wie die hygienische Beurteilung paratyphusbacillenhaltiger Nahrungsmittel mit den Forderungen einer gesunden Volkswirtschaft in Einklang gebracht werden kann, ist eine Frage, die hier nicht zur Erörterung steht, aber gelegentlich in einer anderen Arbeit erneut untersucht werden soll.

Die Paratyphusinfektionen zu verhüten, ist eine Aufgabe staatlicher Hygiene und der Fürsorge jedes einzelnen für seine Gesundheit.

Herrn Geheimrat Prof. Dr. Uhlenhuth möchte ich für seine vielfachen Ratschläge und für die freundliche Unterstützung, die er mir bei der Ausführung der vorstehend beschriebenen Versuche und bei der Anfertigung dieser Arbeit zuteil werden ließ, meinen Dank sagen.

#### Literatur.

- Andrejew, Untersuchungen über die bakterielle Flora des Hammeldarmes auf das Vorkommen von Bakterien der Hogcholeragruppe. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 33.)
- Basenau, Weitere Beiträge zur Geschichte der Fleischvergiftungen. (Arch. f. Hyg. 1893. No. 32.)
- , Ueber eine im Fleisch gefundene, infektiöse Bakterie. (Arch. f. Hyg. Bd. 20. 1894.)
- Böhme, Weiterer Beitrag zur Charakterisierung der Hogcholera-(Paratyphus-)Gruppe. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 52.)
- Bollinger, Ueber Fleischvergiftung, intestinale Sepsis und Abdominaltyphus. Vortrag, gehalten am 24. April 1880.
- Bugge, Die bakterielle Untersuchung von Fleisch notgeschlachteter Tiere. (Zeitschr. f. Fleisch- und Milchhyg. Bd. 18.)

- Bugge, Beitrag zur bakteriologischen Untersuchung des Fleisches notgeschlachteter Tiere. (Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. 1909. H. 7.)
- Cao, Su la presenza di germi patogeni negli organi degli animali da macello. (Giorn. R. Soc. Ital. d'Ig. 1908.)
- Conradi, Ueber Mischinfektion durch Typhus- und Paratyphusbacillen. (Dtsche med. Wochenschr. 1904 u. Klin. Jahrb. Bd. 17.)
- , Eine neue Methode der bakteriologischen Fleischschau. (Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. 1909. H. 10.)
- , Ueber alimentäre Ausscheidung von Paratyphusbacillen. (Klin. Jahrb. Bd. 21. 1909.)
- , Ueber den Keimgehalt normaler Organe. (München. med. Wochenschr. 1909. No. 26.)
- , Zur Pathogenese der Fleischvergiftung. (Zeitschr. f. Fleisch- und Milchhyg. Bd. 20. 1909. H. 4.)
- , Ein Verfahren zum Nachweis spärlicher Typhusbacillen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. 1908.)
- , Eiskonservierung und Fleischvergiftung. (München. med. Wochenschr. 1909. No. 18.)
- , Ein gleichzeitiger Befund von Typhus- und Paratyphusbakterien im Wasser. (Klin. Jahrb. Bd. 17.)
- , Zur Prophylaxis der Fleischvergiftung. (Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. 1910. p. 217—221.)
- Curschmann, Ueber zwei Massenvergiftungen durch Nahrungsmittel in Hessen im Jahre 1905. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 55. 1906.)
- Danysz, Ann. de l'Inst. Pasteur 1900. — Un microbe pathogène pour les rats. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. 14; Compt. rend. T. 112. 1892.)
- Dieudonné, Die bakteriellen Nahrungsmittelvergiftungen. (Würzburg. Abhandl. 1908.)
- , Massenerkrankungen an Kartoffelsalat. (Dtsche militärärztl. Zeitschr. 1904. No. 3.)
- , Ursachen der Fleisch- und Kartoffelvergiftungen. (Verhandl. d. Gesellsch. deutsch. Naturforsch. Meran 1905.)
- Dieterlen, Ueber Pseudotuberkulose bei Meerschweinchen, verursacht durch Bac. paratyph. B. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 30.)
- Durham, On a epidemic of gastroenteritis etc. (Brit. med. Journ. 1898.)
- Edenhuizen, Ueber den Zusammenhang zwischen Schlachtierkrankheiten und Fleischvergiftungen. [Dissert.] Göttingen 1907.
- Eckersdorff, Kasuistische Beiträge zum Vorkommen der Paratyphus-(Hogcholera-) Gruppe. (Arb. a. d. Königl. Inst. f. experim. Therap. zu Frankfurt a. M. 1908.)
- van Ermengem, Recherches sur des empoisonnements produits par de la viande de veau à Morseele. (Bull. acad. de méd. de Belgique. 1892.)
- , Die pathogenen Bakterien der Fleischvergiftungen. (Handb. d. pathog. Mikroorganismen v. Kollé-Wassermann.)
- Forster, Dtsche med. Wochenschr. 1907; München. med. Wochenschr. 1905; München. med. Wochenschr. 1908.
- Franke, Ewald, Aus der Tätigkeit des Laboratoriums am Schlachthofe zu Breslau 1908/1909. (Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. 1909. H. 3.)
- Gaeltgens, Ueber die Bedeutung des Vorkommens von Paratyphusbacillen. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 25.)
- , Ueber das Vorkommen von Paratyphusbacillen im Wasser. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 30; Arch. f. Hyg. Bd. 62.)
- Gärtner, Ueber die Fleischvergiftung in Frankenhausen a. K. und die Erreger derselben. (Bresl. ärztl. Zeitung. 1888.)
- Gaffky u. Paak, Ein Beitrag zur Frage der sogen. Wurst- u. Fleischvergiftungen. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 6.)
- Hübener, Paratyphusbacillen und ihnen ähnliche Bakterien beim gesunden Menschen. (Freie Vereinigung f. Mikrobiolog. Wien 1909; Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. 1909.)
- , Ueber das Vorkommen von Bakterien der Paratyphus-B-Gruppe in der Außenwelt. (Dtsche med. Wochenschr. 1908. No. 24.)
- , Fleischvergiftungen und Paratyphusbacillen. (Dtsche med. Wochenschr. 1910. No. 2.)
- , Fleischvergiftungen und Paratyphusinfektionen. Jena (G. Fischer) 1910.
- Issatschenko, Untersuchungen mit dem für Ratten pathogenen Bacillus. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 21 u. 23.)
- Junack, Zur bakteriologischen Fleischschau. (Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. Bd. 18. 1908.)
- Kurth, Eine typhusähnliche, durch einen bisher nicht beschriebenen Bacillus bedingte Erkrankung. (Dtsche med. Wochenschr. 1909. No. 30/31.)
- Langer, Untersuchungen über einen mit Knötchenbildung einhergehenden Prozeß in der Leber des Kalbes und dessen Erreger. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. d. Haustiere. 1904.)

- Löffler, Die Bakterien der Typhus- und Paratyphusgruppe. (Internat. Kongreß f. Hyg. Berlin 1907.)
- Marmann, Bericht üb. d. Tätigkeit d. bakteriolog. Untersuchungsamtes Göttingen. (Hyg. Rundsch. 1906. No. 17.)
- Mühlens, Dahm u. Fürst, Untersuchungen über Bakterien der Enteritisgruppe. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 48.)
- Mori, Ueber eine bei Katzen aufgetretene, durch einen besonderen Organismus bedingte Epizootie. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 38. 1905. p. 42.)
- Müller, Ueber den Keimgehalt des Fleisches bei septischen Infektionen. (Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. 1909. p. 7—14.)
- Nocard, Bac. de la psittacose. (Publ. de cons. d'hyg. 1893.)
- De Nobele, Les sérodiagnostic dans les affect. gastr. d'origine alimentaire. (Ann. de la soc. méd. Gand. 1899.)
- Portet, Les microbes de la viande. Leur rôle dans les intoxications alimentaires. [Thèse.] Toulouse 1900.
- Rimpau, Zur Frage der Verbreitung der Bacillen der Paratyphusgruppe. (Dtsche med. Wochenschr. 1908. No. 24.)
- , Beitrag zur Frage der Verbreitung der Paratyphusbacillen. (Arb. a. dem Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 30; Vierteljahrsber. d. Station Hagenau 4. Vierteljahr 1908.)
- Rommeler, Kommen im Blut und in der Gallenblase gesunder Schweine Schweinepestbacillen vor? (Klin. Jahrb. Bd. 21. H. 4.)
- , Zur Theorie und Praxis der bakteriologischen Fleischschau. (Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. Bd. 20. No. 4.)
- , Ueber Befunde von Paratyphusbacillen in Fleischwaren. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 50. 1909.)
- , Paratyphusbacillen im Transporteis der Seefische. (München. med. Wochenschr. 1909. No. 20.)
- Schern, Ueber das Verhalten verschiedener Stämme des Bac. paratyph. B und Bac. enteritidis Gärtner in Arabinose- und Xylose-Lackmusbacillen. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 33.)
- , Ueber eine durch den Bac. enteritidis Gärtner hervorgerufene Rattenseuche. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 30. 1909. H. 3.)
- Schottmüller, Weitere Mitteilungen über mehrere das Bild des Typhus bietende Krankheitsfälle (Paratyphus). (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 36. p. 368.)
- Smith, The Hogcholera group of bacteria. (Centralbl. f. Bakt. Bd. 16. 1894.)
- Schmitt, Der Bac. paratyph. B. als Krankheitserreger bei Kälbern. (Dtsche tierärztl. Wochenschr. 1908. No. 47 u. 48.)
- , Klinische und bakteriologische Untersuchung einiger vom seuchenhaften Kälbersterben befallener Bestände. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. d. Haustiere. Bd. 5. H. 5.)
- Sternberg, Paratyphus B im Wasser. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 34. 1900.)
- Titze u. Weichel, Ueber die Aetiologie der Kälberruhr. (Dtsche tierärztl. Wochenschrift. 1909.)
- Trautmann, Der Bacillus der Düsseldorfer Fleischvergiftung etc. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 45. 1903.)
- , Bakterien der Paratyphusgruppe als Rattenschädlinge und Rattenvertilger. (Zeitschrift f. Hyg. Bd. 44.)
- Trommsdorff, Ueber Mäusetyphusbacillen und seine Verwandten. (Arch. f. Hyg. Bd. 55.)
- , Ueber Pathogenität des Löfflerschen Mäusetyphusbacillus beim Menschen. (München. med. Wochenschr. 1903.)
- Uhlenhuth, Zur Kenntnis der gastrointestinalen Fleischvergiftungen und der biologischen Eigenschaften ihrer Erreger. (v. Leuthold Gedenkschrift. Bd. 1.)
- u. Hübener, Weitere Mitteilungen über Schweinepest mit besonderer Berücksichtigung der Bakterien der Hogcholera-Gruppe. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 29. 1909.)
- , —, Xyländer, Bohtz, Untersuchungen über das Wesen und die Bekämpfung der Schweinepest. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 27. H. 3.)
- , Haendel u. Schern, Zur Schweinepest. (Berlin. tierärztl. Wochenschr. 1909.)
- Zeller, Untersuchungen über 40 aus kranken Kälbern gezüchtete Stämme der Paratyphusgruppe. [Inaug.-Dissert.] Leipzig 1908. (Zeitschr. f. Infektionskrankh. d. Haustiere. Bd. 5. H. 3 u. 4.)
- Zwick, Zur Frage des Vorkommens von Enteritisbakterien im Pökelfleisch. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 33.)



*Nachdruck verboten.*

## The relationship of the acid-fast bacilli.

[From the Serological and Bacteriological Department of the Krankenhaus Eppendorf-Hamburg (Dr. Much).]

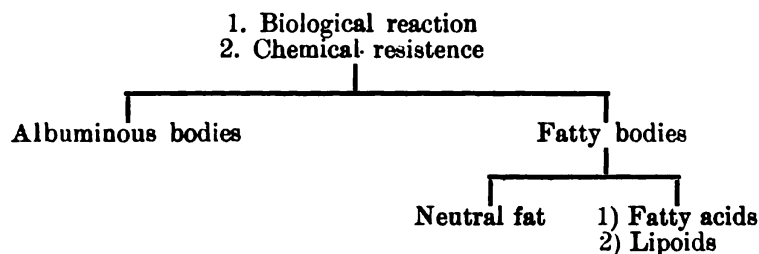
By Fred. F. Wills.

### Introductory.

Before entering upon our work and its results, we consider it necessary, at once, to offer some explanation under this head, of the very valuable information which has so materially assisted in the work undertaken under the different sub-heads of this thesis. We desire, too, strongly to express here, that it is the object of this paper only to record the results presented and information gathered in the course of our work with the "acid-fast bacilli".

### I.

The relationship of the acid-fast bacilli depends not only on their morphological character, but also on their



Formerly it was believed that only the albuminous bodies were specific and able to produce specific anti-bodies. But recent experiments have shown that even lipoids are able to produce specific anti-bodies. And still greater progress in our knowledge of the formation of anti-bodies was made when Much<sup>1)</sup> discovered that even purely fatty substances are able as well to produce specific anti-bodies as albuminous substances.

The first fatty substance that was proved to produce specific anti-bodies was nastin (Deycke).

When Deycke published his experimental work upon nastin, the medical world gave greater attention to the therapeutic aspects, and correctly so, than to the merely biological importance of his results, namely that a purely neutral fat in crystalline form is able to give a biological reaction in the living organism, not only against leprosy, but even against tuberculosis.

The above fact has been proved by the injection of nastin into both leprosy and tuberculous patients, and in both cases strong reaction was obtained that even could prove dangerous in some cases.

A similar substance to nastin, prepared from the tubercle bacillus, and called tuberculo-nastin, gives not only reaction in cases of tuberculosis, but also in leprosy.

1) Much, Nastin. (Münch. med. Wochenschr. 1909.)

## II.

Deycke and Much have established, by further investigations, that they could never obtain such immunity with the albuminous substance alone of the tubercle bacillus, but only when they mixed the albuminous bodies and the fatty bodies, i.e., nastin, that they could establish immunity. They say, too, that the immunity obtained by tuberculo-albumen with nastin is easier to be produced than with nastin alone.

## III.

The fat anti-bodies could be demonstrated in vitro with the aid of that subtle serological method, viz., the complement fixation test.

Much found in leper patients that had been treated with nastin, complement-fixating bodies against nastin, while other leper patients that had not been treated with nastin did not give the same reaction.

After Much had found that leprosy cases that had been treated with nastin (Deycke) gave complement fixation against an emulsion of this pure fatty substance, Kleinschmidt, in Much's laboratory, tested sera of lepers that had been treated with Chaulmoogra oil against an emulsion of this oil. Of five lepers who were undergoing the treatment, two gave a marked positive reaction with an emulsion of Chaulmoogra oil 1:1500. This we believe to be the second instance of formation of specific antibodies against a purely neutral fat.

It is very remarkable that the biological activity of these fatty substances (nastin and Chaulmoogra oil), which has been shewn by the formation of specific anti-bodies in leprosy sera after treatment, should correspond so well with their clinical effects and therapeutic efficiency.

## IV.

From the above-mentioned work of Much, some relation appears to exist between leprosy and tuberculosis. The relationship of all acid-fast bacilli has been the subject of further investigations of Much and Hössli<sup>1</sup>).

In their complement-fixation reactions, they used as antigen not the usual bacilli emulsion of Koch, but emulsions of acid-fast bacilli in physiological salt solution and 0.5 per cent phenol-glycerine, which they themselves prepared in the agate mortar.

They tested human sera that gave complement-fixation with tubercle emulsion and tuberculin, against all the following non-pathogenic acid-fast bacilli:

Urine bacillus, blind-worm tubercle-like bacillus (as occur in reptiles), Timothy grass bacillus; a description of these bacilli appears under Part I.

They found that the sera, that gave positive reaction with tuberculous antigens, gave also a positive reaction with these non-pathogenic acid-fast bacilli; there was only a quantitative difference, i. e., sera that gave a strongly positive reaction with tuberculous antigen, gave only slightly positive reaction with the non-pathogenic, with the exception of Timothy grass bacillus.

1) Much and Hössli, Tuberkulosestudien. (Beitr. z. Klinik d. Tuberk. 1910.)

Of 19 Sera tested, against:	
Tubercle bacillus	19 positive
Urine bacillus	13 "
Blind-worm bacillus	4 "
Timothy gras bacillus	0 "

The conclusions they arrived at were: 1. That the specific complement-fixing substances of tubercle bacillus are the same as these of the other related non-pathogenic, acid-fast bacilli, and that the tubercle bacillus only differs quantitatively, i. e., possessing a larger amount of these specific substances. 2. The complement-fixation reaction with tuberculin does not always give the same results as the complement-fixation reaction with tubercle bacilli emulsions. Only in 57.6% the reaction is positive with both antigens. Nearly the same percentage, i. e., 58.4%, has been obtained by Deilmann in 118 cases so treated. This difference is to be explained by the difference in quantity of specific substance in the different antigens. Much and Hössli even found that different tuberculins, e. g. tuberculin Koch and tuberculin Behring, did not always give the same reaction.

### V.

The specificity of complement-fixation with tuberculosis sera. Since the first complement-fixation reaction with tuberculin (Wassermann and Citron), the question has arisen as to whether the complement-fixation is specific or not.

Citron<sup>1)</sup> stated as his opinion, that the complement-fixation reaction is of practical value in the diagnosis of tuberculosis, when the other methods of clinical diagnosis do not give sufficient certainty.

Cohn<sup>2)</sup>, Wolff and Mühsam<sup>3)</sup>, Weil and Strauss<sup>4)</sup> found anti-bodies against tuberculin in the sera of grave cases of tuberculosis as well as in the beginning of the infection which they think to be specific, while others, for instance Wolff-Eisner and Ascher<sup>5)</sup>, Laub and Novotny<sup>6)</sup>, hold that complement-fixation with tuberculin is an entirely non-specific reaction. Kleinschmidt<sup>7)</sup>, who in the laboratory of Much, was the first to do complement-fixation, not only with tuberculin, but also with tuberculo-nastin, and nastin (Deycke), came to the conclusion that "the complement-fixation with tuberculin and tuberculo-nastin is specific as occurring only in cases of tuberculosis and leprosy".

Much and Hössli have by their experiments found that the complement-fixation reaction against tuberculin with tubercular patients has to be divided into two classes:

Firstly a) The positive reaction of patients that have not been treated with tuberculin injections is caused by specific anti-bodies in the serum, these specific anti-bodies are produced by substances that are common to all acid-fast bacilli.

b) These sera never give reaction with non-specific antigens, as peptones, albumoses, or bouillon.

- 1) Berl. klin. Wochenschr. 1907. No. 36.
- 2) Ibid. 1908. No. 28.
- 3) Dtsche med. Wochenschr. 1908. No. 35.
- 4) Wien. klin. Wochenschr. 1908. No. 28.
- 5) Ibid. 1908. No. 37.
- 6) Ibid. 1909. No. 31.
- 7) Berl. klin. Wochenschr. 1910. No. 2.

Secondly, the positive reaction in cases that have been treated with tuberculin is caused by specific and non-specific anti-bodies

a) the specific antibodies are the same as in the cases that have not been treated by tuberculin,

b) the non-specific anti-bodies are produced by the non-specific albumoses of tuberculin. These sera therefore give a positive reaction with peptone solution or bouillon, which is much weaker than the reaction against tuberculin.

We have dealt above with cases of specific antibodies in the sera of tuberculous patients, but how are we to explain the fact that these same anti-bodies appear in the sera of adults who have no signs of tuberculosis.

Much with Hössli in their paper on the subject say, "the investigations of recent years in the field of tuberculosis, have clearly proved that specific reactions do not always express the fact of clinical tuberculosis, we refer to the excellent works of Römer and to our own researches. If we get a positive reaction, it is not at all proof that the individual is tuberculous; the person might be only immunized.

The interesting chapter of self immunization against tuberculosis and of latency have clearly proved that a biological reaction of tuberculosis does not always correspond to clinical tuberculosis. We know that even in cases of no clinical tuberculosis the biological reaction of tuberculosis might be positive in a specific sense, i. e., in the sense of self immunization or latency. A positive reaction only means that the individual has come once at least in his life into contact with tuberculosis virus. The data of this coming into contact could only be given by the physician and not the biologist."

The researches of recent years have shewn that with the aid of our most delicate biological reaction of tuberculosis, i. e., by the cutaneous reaction, we obtain a positive result in about 98% of all adults, say from the 15th year; therefore, we cannot be surprised to find in another biological reaction where the same antigen is used against the same antibodies, i. e., the complement-fixation, — positive results are obtained in a large number of persons that have no clinical signs of tuberculosis.

Deilmann, in our laboratory, has recently tested 238 sera of various persons, and has obtained 118 positive reactions with tuberculous antigens, i. e., 50%.

The fact that the complement-fixation does not give similar high results as the more delicate cutaneous reaction (although it is caused by the same anti-bodies) is to be explained by the existence of complementoids and haemolysins in the sera; if we take out these bodies by the method that has been worked out by Holmgreen, in the laboratory where we did our work, there is at once a much higher percentage of positive reactions of the sera of all adults.

We need not repeat that these complement-fixations with sera of persons shewing no signs of active tuberculosis, are entirely specific. We refer to what has been stated above by Much and Hössli.

## Part 1.

**The acid-fast bacilli: tubercle, leprosy, urine, blind-worm, Timothy grass.**

**Tubercle bacillus.** A description is not necessary in this paper, the bacillus is already widely known, and full details are stated in every text book on bacteriology.

**Leper bacillus.** The remark above on the tubercle organism also apply to leprosy; no useful purpose would be served by a repetition of well established facts.

Of the other organisms which we are to deal with, as they are perhaps not so widely known as the above two of the acid-fast group, a short description of them might be useful.

**Timothy grass bacillus<sup>1)</sup>** of Moeller, isolated from a grass (*Phleum arvense*), acid-fast, grows readily on culture media, and not so acid-fast as the tubercle bacillus.

**Urine bacillus:** Is very rare.

**Culture:** On the usual agar and bouillon, grows readily in a few days.

On tubercle bouillon, grows in 2 to 4 days. The culture-growth in bouillon forms a creamy, thick, coherent, dry crinkled layer on the surface, and it climbs up the wall of the flask. It must float on the surface in order for growth to take place, and from the surface stalactite-like growths are sent down into the bouillon.

**Pathogenicity:** For rabbits not virulent, for guinea pigs, in usual dose, it is not virulent, but by large doses, viz., 0.4 g. given intra-peritoneally, death quickly takes place from acute plastic peritonitis.

**Origin:** Found in a case of normal urine.

**Blind-worm bacillus.** The culture that was used in our experiments had been found in a reptile (blind-worm). This tubercle-like bacillus of reptiles appears in German works as *Blindschleiche* = blind-worm or slow-worm. For the purposes of this paper, the term blind-worm bacillus has been adopted throughout for this tubercle-like bacillus of reptiles.

**Culture:** Grows only on tubercle bacillus bouillon, culture-growth resembles that of the urine bacillus.

**Pathogenicity:** Not virulent for warm blooded animals.

**All the above bacilli resemble one another, being like the tubercle bacillus :**

1. a) In form,
  - b) in variety of form — shew beaded or granular form — seen in old cultures.
2. Staining reaction:
  - a) Acid-fast,
  - b) red color with carbol-fuchsin,
  - c) all are gram-positive,
  - d) all stain well by Much's modification of Gram — the Gram-Much being particularly suitable for the granular forms.

## Part 2.

**The acid-fast bacilli — their behaviour and relationship in the reaction of complement-fixation.**

The important character of the staining reactions and the outward resemblances, microscopically, supply a certain amount of information as regards their relationship.

1) Hewlett, Manual of Bacteriologie, 3<sup>rd</sup> ed. p. 316.



The writer, working with some of the "acid-fast" bacilli, viz., tubercle, leprosy, urine, blind-worm, and Timothy grass, desires to record the results obtained with these bacilli; the object in view, as already mentioned, is to state the facts which experiments with the five bacilli just named have shewn; that not only do these organisms — though differing so widely in the very important factor of pathogenicity — exhibit by their biological reaction, and by their chemical consistence, certain definite characteristics which point towards a relationship stronger than mere staining resemblance and outward appearance but also a kinship from a common stock.

I. Complement-fixation of human sera with acid-fast bacilli as antigen, viz., tubercle, leprosy, urine, blind-worm and Timothy grass.

Remarks as to the method of complement-fixation. — The bacillus or substance to be used as antigen is made into an emulsion and first tested for self-fixation according to Wassermann, and the "titre" obtained in the usual manner.

The sera and haemolytic system are of course used and prepared after the manner of Wassermann reaction.

Deilmann working at the same time in the laboratory, the writer has had ample opportunities of access to his work at all times, as it would have only meant duplication of labour with similar results, and as Deilmann so kindly gave the use of this part of his work, it was considered not necessary to go over the field. His examination of serum was made from time to time, and covered the large number of 238 cases. The method Deilmann adopted was 1) The serum was tested by complement-fixation for anti-bodies of tuberculosis, the antigen used being 1:60 tubercle bacilli emulsion (0.075 cc.) and tuberculin (Koch) (0.04 cc.). 2) All the sera giving a positive reaction were selected for further examination. 3) The complement-fixation test was next tried with all the sera showing tuberculosis anti-bodies, against emulsions of leprosy bacillus, urine bacillus, blind-worm bacillus, and Timothy grass bacillus.

For the purpose of this paper, 18 of the sera so dealt with and the results, are submitted in Table I.

In table I, as would be expected, the tubercular anti-bodies stand out prominently. This is as it should be, for it would be impossible to conceive, in countries where tubercular disease is very old and widespread, that anti-bodies should not be present in the serum without the presence of active tuberculosis: but it is not our purpose to discuss the specific nature of the anti-bodies of the tubercle organism; much has already been stated in the introductory remarks. Our undertaking is to point out that in so far as the various acid-fast bacilli named are concerned, they shew a relationship other than staining reaction and similarity in outward form.

It is to be noted that with exception of blind-worm bacillus, which shows only a slight reaction in a single instance of the eighteen sera, all the other bacilli give a strong positive reaction with more than one of the series.

Timothy grass bacillus, as would be observed, gives two strong positive reactions, and on each occasion of fixation, the result is similar to that of tuberculin and the tubercle bacillus with the same serum.

Table I.  
Human sera — showing tuberculosis anti-bodies.  
Complement fixation with acid-fast bacilli.

No.	Serum (quantity)	Tuberculin 0.04	Tubercle bacilli Emulsion 0.075	Leper bacilli Emulsion 0.1	Urine bacilli Emulsion 0.1	Timothy Grass bacilli Emulsion 0.06	Blind-worm bacilli Emulsion 0.2	Clinical signs of tuberculosis
1	0.2 cc.	+++	+++	+	+	+++	0	None
2	0.2 "	+++	+++	+++	0	0	0	"
3	0.2 "	+++	0	+++	0	0	0	Tuberculosis of lungs
4	0.2 "	++	++	+++	0	0	0	None
5	0.2 "	++	++	+	0	0	0	"
6	0.2 "	+++	++	0	+	+++	+	"
7	0.2 "	+++	++	0	0	0	0	None, but positive, cutaneous reaction
8	0.2 "	++	++	0	0	0	0	None
9	0.2 "	+++	+	0	0	0	0	Tubercul. family, himself, no Tuberculosis
10	0.2 "	+++	+	0	0	0	0	None
11	0.2 "	+	+	0	0	0	0	"
12	0.2 "	+	+	0	0	0	0	"
13	0.2 "	+	+	0	0	0	0	"
14	0.2 "	+	0	0	0	0	0	"
15	0.2 "	++	0	0	0	0	0	Caries pelvis
16	0.2 "	+	+		++	0		
17	0.2 "	+	++		++	0		
18	0.2 "	+++	+		+++	0		

Urine bacillus, strongly positive in one case, positive in two other sera, and slightly so in two cases; whether weak or strong, the results are in accord with the behaviour of tubercle bacillus and tuberculin against the said sera.

Leper bacillus. Here the results are more strongly marked than with the non-pathogenic organisms above. In three instances the complement-fixation test has given very strong positive reaction, and in two others shew a weak positive; all the results are on similar lines with the treatment of the same sera with tuberculin and the tubercle bacillus; except in one instance the serum with tubercle shewed a negative result.

If Table I be referred to, and the following sera, viz., 1. 2. 3. 4. 5. 6. 16. 17. 18. be given some attention, the results point to a connecting link, though slight in some instances, yet of sufficient note for interest, as further observations in other directions have helped materially to strengthen what appears here to be of slender evidence; but to return, we must note that in at least two of the series of sera, namely, 1. and 6., anti-bodies appear constant with four of the organisms used as antigen, in other words, the results of the experiments point to some property or antibodies present in the serum and common to all the organisms. We may record the same facts in another form, as follows:

Complement-fixation of sera shewing tuberculosis anti-bodies against the acid-fast bacilli as antigen. Of 18 cases:

Blind-worm bacillus	5 %	positive
Timothy gras bacillus	11 "	"
Urine bacillus	27 "	"
Leprosy bacillus	27 "	"
Tubercle bacillus	83 "	"

## II. Complement-fixation of goat's immunized sera<sup>1)</sup> against the acid-fast bacilli as antigen.

Much and Leschke have kindly consented to the inclusion, in this thesis, of their work in preparing two goats for immunization against tuberculosis.

The writer has on nearly all the occasions been present, and assisted when the injections were made. The sera of the goats have been from time to time tested, and the results were always good and of high specific quality.

The goats were prepared in the following manner:

Goat I.

Injections of solutions of tubercle bacilli in lactic acid, namely, 5 g. tubercle bacilli in 100 g. lactic-acid 1<sup>0</sup>/<sub>0</sub>.

The dose given on each occasion was 5 cc.

This goat received on the whole 5 injections, at intervals of a fortnight, the dose being the same on each occasion, the injections being given subcutaneously.

Goat II.

Was treated by injection of solution of tubercle bacillus in tartaric acid, namely, 5 g. tubercle bacilli in 100 g. tartaric acid 1<sup>0</sup>/<sub>0</sub>. The dose here was increased to 10 cc., and within the course of a month this goat received two injections of 10 cc. each. The injections, as in the case of goat I, were administered subcutaneously.

For the purposes of examination, blood was taken from the ear of each goat, collected in tubes, immediately centrifuged, and the serum tested. As already said, the testing of the sera of these goats was regularly made (partly by the writer) and the state of immunity reached in these animals must prove of far-reaching value in the question of immunization of animals against the *Bacillus tuberculosis*.

The complement-fixation test has been made with the serum of each of the goats against the acid-fast bacilli with which this paper is treating. The results are given in Tables II and III.

Unfortunately, the first testings recorded in Table II had to be made without the leper bacillus, as the supply of the laboratory had run short. Just a glance at this table, and information of value is supplied. Perhaps it may not be surprising to see that anti-bodies of tuberculosis should be present in such weak dilutions of sera against the tubercle bacillus; but that the urine bacillus, with these specific sera so highly charged with anti-bodies of tubercle, should give, in such dilutions, so strong a complement-fixation, undoubtedly points to some property or properties present in both of these sera that must be also common to both the tubercle and urine bacillus. As must be noted (but we do not think with surprise) the blind-worm bacillus and Timothy grass bacillus have given negative results

1) Much, Ueber neuere Verfahren zur Tuberkelbacillenaufschliessung.

2) Leschke, Ueber Aufschliessung von Tuberkelbacillen etc. [Biol. Verein Hamburg.] (Münch. med. Wochenschr. 1911. No. 11.)

Table II.  
Immunised sera of goats, 1 and 2 against.  
The acid-fast bacilli.

Serum (quantity)	Tubercle bacilli Emulsion		Urine bacilli Emulsion		Blind-worm bacilli Emulsion		Timothy grass bacilli Emulsion	
	Goat 1	Goat 2	Goat 1	Goat 2	Goat 1	Goat 2	Goat 1	Goat 2
0.2 cc.	+++	+++	+++	+++	+	+	(+)	(+)
0.1 "	+++	+++	+++	+++	0	0	0	0
0.075 "	+++	+++	+++	+++	0	0	0	0
0.05 "	+++	+++	+++	+++	0	0	0	0
0.025 "	+++	+++	+++	+++	0	0	0	0
0.01 "	+++	+++	+++	+++	0	0	0	0
0.0075 "	+++	+++	+++	+	0	0	0	0
0.005 "	++	+	++	0	0	0	0	0
0.0025 "	++	+	+	0	0	0	0	0

Table III.  
Goat 1 (tested at a later time).

Serum (quantity)	Leper bacilli Emulsion	Tubercle bacilli Emulsion	Urine bacilli Emulsion	Blind-worm bacilli Emulsion	Timothy grass bacilli Emulsion
0.1 cc.	+	+++	+++	+++	++

with such weak solutions as 0.1 cc. of specific sera, but it might be mentioned that with 0.2 cc. of the sera both of the organisms have given positive results.

Table III represents the testing of the immunized serum of goat I against all the acid-fast bacilli; this was done at a later time than Table II. The tubercle and urine bacilli remain unaltered, the complement-fixation being strong, but with them must now be included the blind-worm bacillus, which has also given strong positive results. The bacillus of leprosy and timothy grass have also fallen into line with the other bacilli, their reactions not being so marked, the leprosy bacillus even giving a weaker result than that of the *Bac. timothy grass*. This is to be explained by the fact that the leper bacilli could not be used in pure culture but from anti-formin solutions of lepromata. As they possess a large amount of self-fixating bodies, much weaker dilutions have to be used as compared with the other acid-fast bacilli. The main point, though, is not the quantitative, but the fact that even the weak dilutions of leper bacilli have given a positive reaction with tuberculous anti-bodies.

The positive reaction of the tubercle-bacillus might be looked upon as a matter of course, but that urine, blind-worm, and Timothy grass bacilli with serum so richly charged with anti-bodies of the tubercle organism should give a positive reaction, seems to give these organisms a relationship to the tubercle bacillus, not only, as is well known, morphologically, and in their staining powers by Ziehl-Neelsen and Gram-Much methods, but also a connection far deeper and stronger, that is to say, inherent qualities which are common to these organisms in chemical consistence and biological reaction. If the results of these Tables (viz., II and III) do not assert this conclusion, what then could be the cause for the complement-fixation of immuned bodies against the tubercle bacillus with

the bacillus of leprosy, urine, blind-worm, and timothy grass? The more, as the goats had been treated with the pure substances of the tubercle bacilli without any other non-specific substances (as are contained in tuberculin). Is it not that there is a definite property common to all these micro-organisms? The results of further examination may perhaps supply facts of a yet more definite character.

### III. Complement-fixation of leper sera with acid-fast bacilli.

Let us now view the results of the reaction of other specific sera, namely, leper sera, with the acid-fast bacilli with which we are at present concerned. For this purpose thirteen sera have been obtained as follows: 11 leprous and 2 tuberculous, these are all positively known cases, and are at present under treatment. It may be well to mention here that one of the cases — No. 11 — has been treated with nastin (Deycke).

Table IV.  
Complement fixation of leper sera, against acid-fast bacilli.

No. of Ser.	Serum and quantity	Leper bacilli Emulsion 0.1	Human tubercle bacilli Emulsion 0.06	Bovine tubercle bacilli Emulsion 0.075	Urine bacilli Emulsion 0.1	Blind-worm bacilli Emulsion 0.2	Timothy grass bacilli Emulsion 0.06
1	Leper 0.2 cc.	+++		+++			
2	do.	+++—+ <sup>1)</sup>	+++	+++	+++	+++	+++
3	"	+++—+	+++	+++	+++	+++	+++
4	"	0	0	0	0	0	0
5	"	0	+++	+++	+++	0	+++
6	"	0	+++	+—0	+—0	0	+++—+
7	"	0	+—0 <sup>2)</sup>	0	(+)—0	0	+—0
8	0.1 cc.	+++	+++	+++	++	++	+
9	0.2 "	0	+—0	0	0	0	0
10	0.1 "	+++	+++	+++			
11	0.2 "	+++		+++	+++	++	+—0
12	Tubercul. 0.2 cc.	++	+++	+++	+++—+	+++—+	+++
13	do.	+	+++—+	++	+++—0	+++—0	+++

Table IV gives, we believe, ample proof in support of previous remarks regarding the family connection of the acid-fast bacilli; in this instance two different series of human specific sera have been tested with these organisms as their antigen; that these sera should contain immune bodies against their specific micro-organism is beyond doubt.

It may be well to mention, too, what is of common knowledge to workers with both of these specific sera, that the complement-fixation test is not positive in every instance where it is expected to be, i. e., where the disease is active, as in tuberculous disease, the serum of many cases when tested with the tubercle bacillus as the antigen, complement-fixation does not always take place. It is also admitted that it cannot be adopted for diagnostic purposes, but for confirmation of diagnosis it is certainly valuable. On the other hand, as just said, the value in cases of tubercular disease may not be as great as we desire. Hewlett<sup>3)</sup>

1) +++—+ = +++ after 1 hour, + after 24 hours.

2) +—0 = + after 1 hour, 0 after 24 hours.

3) Hewlett, Manual of Bacteriology. 3. ed. Vol. 3. p. 299.



concludes that tuberculous anti-bodies appear to be absent in cases of localized or latent tuberculosis, and the test cannot therefore be applied. But this opinion can no longer be held according to what we have learned from the work of Much, Hössli and Deilmann. For further information we refer to "the specificity of complement-fixation with tuberculous sera", Part V of introductory remarks.

We contend that the complement-fixation test with leprosy is specific; this fact has been disputed by many authorities, because it has been found that leper sera gave complement fixation, not only with antigen prepared with leper bacilli, but also with many other antigens.

Wassermann's reaction with syphilitic antigen has been found by certain investigators to give positive results.

Positive complement-fixation reaction has been also obtained against tuberculin. Meyer, Platineau and Danielopolu, Frugoni and Pisani<sup>1)</sup> and Kleinschmidt<sup>2)</sup> found this reaction to be positive in more than half of the cases.

Complement-fixation with extracts from lepromata has been tried for diagnostic purposes with satisfactory results by Gaucher and Abrami<sup>3)</sup> and Sugai<sup>4)</sup>.

Again, positive complement-fixation has been obtained against extracts of tumors (carcinoma and sarcoma) by Frugoni and Pisani<sup>1)</sup>.

Opinion has therefore been held that all these complement fixing bodies in the sera of lepers are non-specific, but this view, though at first sight, it appears convincing, is in our opinion incorrect. It must be admitted that leprous sera, more than perhaps any other sera, have a great tendency to complement-fixation with any reactive antigen; also more than any other sera with which we have dealt, they seem to have a tendency to self-fixation. These tendencies, we believe, explain the non-specific reactions with extracts of different organs and tumours. But they do not explain the complement-fixations with specific antigens, and the quantitative differences in the strenght of these reactions corresponding perhaps with the quantitative differences contained in the specific substances of the different acid-fast bacilli. If the lepra sera had given a strongly positive reaction throughout with all the acid-fast bacilli, the specific nature of the reaction could then be doubted, but the differences which we have found in the complement-fixations of the lepra sera under review against the acid-fast bacilli, exactly correspond with the same differences in the specific anti-bodies of tubercular sera with the acid-fast organisms, clearly proving that the complement-fixation of leprous sera with specific antigens, i.e., antigens prepared from acid-fast bacilli, is specific.

The above are not the only facts in favour of the specific nature of the complement-fixation of leprous sera. The next in support we take from the results obtained, for leper serum does not give complement-fixation with other micro-organisms or other albuminous bodies. We have tested our sera in the same manner as was done with the acid-fast bacilli, against streptococci and staphylococci emulsions and the

1) Berl. klin. Wochenschr. 1909. No. 33.

2) Berl. klin. Wochenschr. 1910. No. 2.

3) Lepra. Bd. 8. 1909.

4) Arch. f. Dermat. Bd. 95. 1909.

usual sterile bouillon, and it would be seen from Tables V and VI that no complement-fixation has been obtained from these non-specific organisms.

Table V.  
Leper sera, against bouillon.

No. of serum	Serum (quantity)	Tuberculin (Koch) 0,01	Urine bacilli bouillon 0,04	Blind-worm bacilli bouillon 0,05	Leper bouillon culture 0,45	Bouillon 0,5
2	0.2 cc.	+++	+++	+	+++	
3	0.2 "	+++	++	+(+)	+++	0
4	0.2 "	+++	0	0	++	0
5	0.2 "	+++	++	0	+++	
7	0.2 "	+0	+(+)	trace	++	0
9	0.2 "	+0	+	0	0	0
11	0.2 "	++	0	0		0

Table VI.  
Complement fixation of leper sera, against different non-specific antigens.

No. of serum	Serum and quantity	Control	Chaulmoogra vil 1:1500	Wassermann reaction	Cocci	
					Staphylo-	Strepto-
1	Leper 0.2 cc.	0	+—0 <sup>1)</sup>			
2	" 0.2 "	0	+—0	+++	0	0
3	" 0.2 "	0	+	0	0	0
4	" 0.2 "	0	0	+++	0	0
5	" 0.2 "	0	0	+++	0	0
6	" 0.2 "	0	0	0	0	0
7	" 0.2 "	0	0	0	0	0
8	" 0.1 "	0	+	0	0	0
9	" 0.2 "	0	0	0	0	0
10	" 0.1 "	0		0	0	0
11	" 0.2 "	0		+++	0	0
12	Tuberculosis	0	0	0	0	0
13	"	0	0	0	0	0

It has been sufficiently shown that the complement-fixation with leprous sera against acid-fast bacilli is specific — firstly from the quantitative differences shown with the individual acid-fast organisms. Secondly, by the negative results obtained with the non-specific antigens.

Besides, there exists a non-specific reaction against the same antigens as with Wassermann's reaction.

To return to Table IV. As to be expected, the leper organism has not given a positive reaction with all its corresponding sera, nevertheless, the fact of a strongly positive reaction in 6 cases from 11 tests should mark the reaction as important, and the more remarkable, as has been before pointed out, that much weaker solutions have been used as compared with the other acid-fast organisms. This fact explains the negative result in some cases, when the reaction with tubercle bacilli is positive. In the two tubercular cases, though the tests do not shew very strong positive reactions with leper bacilli, yet the result with serum No. 12 is sufficiently marked.

From the results revealed in this table, could it be upheld that these acid-fast bacilli are distinct and apart from one another, and that merely

1) +—0 = + after 1 hours, 0 after 24 hours.

by the coincidence of their form and colour-staining reaction they are to be classed together? Certainly not. The whole drift of the results tends in one direction to the proof of their strong ties by properties common to each group of the acid-fast class.

Again, it is to be questioned why independent organisms used as antigen to specific sera should react in a similar manner to the specific organisms when used as antigen for their corresponding sera. Is it mere resemblance in form and resistance to acids that account for:

a) Leper sera — the urine bacillus, giving a strong positive reaction in 5 of 9 cases, blind-worm bacillus 4 positive reactions in 9 cases, to be noted that in one case the reaction was strong; Timothy grass bacillus, 5 positive fixations in 9 cases, three of the reactions being strongly positive.

Though it is intended to deal separately with the strong links that appear to connect leprosy and tubercle bacilli more closely even than the other non-pathogenic organisms, the strong positive reactions of both human and bovine tubercle bacillus, as shewn with the series of specific leprosy sera, must not be overlooked even at this stage. We cannot help noting that of 9 of the leprosy sera treated with human tubercle bacillus as antigen, strong positive reaction was obtained in 6 instances, and of 11 leper sera tested with bovine tubercle bacillus as antigen, complement-fixation was strong in 7 cases.

This slight difference of course is of no importance. Surely it is not correct to regard the types human and bovine tubercle as different species.

It will be observed that where the readings of the different antigens against the sera did not remain the same during 24 hours, the results have been omitted above; yet sufficiently interesting facts remain and may be expressed thus:

Testing of leper sera against acid-fast bacilli emulsions as antigen:

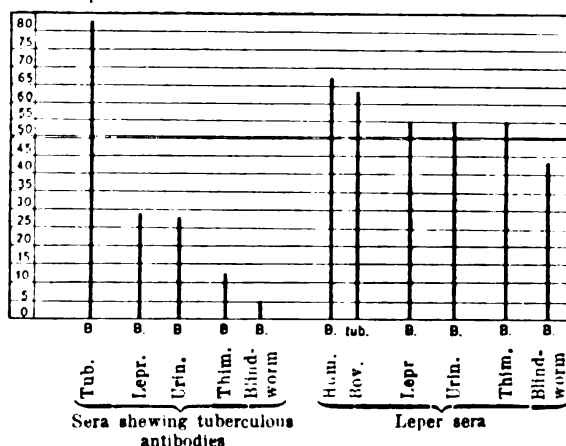
Leper bacilli positive after 24 hours	55 %
Human tubercle positive after 24 hours	66 "
Bovine " " " "	63 "
Urine " " " "	55 "
Blind-worm " " " "	44 "
Timothy grass " " " "	55 "

b) The tuberculous sera, too, offer sufficient for attention; the the micro-organisms, viz., human tubercle, bovine tubercle, leper, blind-worm, urine, timothy grass, giving a positive result with one or other of these specific sera.

If the reactions of the following sera be looked at, namely, 2, 3, 8, 12, it would be immediately recognised that whether the serum be leper specific or tuberculous specific, the several micro-organisms have behaved in the same manner, showing only a difference in intensity. The leper sera even show a greater percentage of positive reactions than the above tested tuberculous sera and sera of normal persons with no active tuberculosis. (Part II 1.)

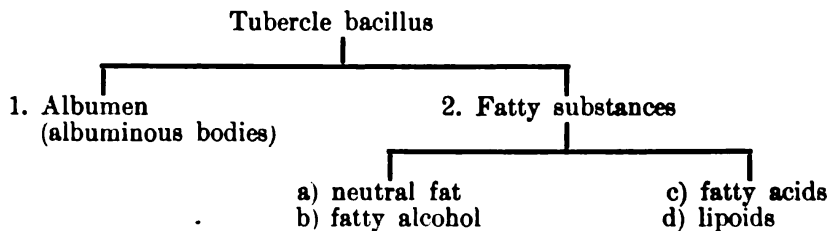
In order to obtain better information as to the further proof of the relationship of these micro-organisms, the complement-fixation test of the substances of the tubercle bacillus as antigens has been made against specific sera of leprosy and tuberculosis, but before passing on, the chart below might demonstrate more clearly the facts just stated.

Complement-fixation with acid-fast bacilli.



#### IV. The complement-fixation test of leper and tuberculosis sera against the substances of tubercle bacillus.

The tubercle bacillus if split up into its component parts is as follows: (Taken from a paper of Much, *Neuere Ergebnisse über d. Biol. des Tuberkelbacillus. Ergebnisse d. wissenschaftl. Med.* 1911. März.)



2. a) b) = tuberculo nastin, c) acid-fast substances (red staining with carbon-fuchsin).

1. The fatty acids. They are obtained by the method described by Deycke in the following manner:

Tubercle bacilli are boiled with KOH. (caustic potash) until all the acid-fast substance is saponised and disintegrated; it is then neutralised with HCl; the sediment thereby formed is washed out and extracted with absolute alcohol, the alcoholic extract contains the fatty acids, i. e., the acid-fast substance and the lipoids.

In order to obtain a good emulsion for serological purposes, we use the method of Much, which consists in dissolving the fatty acids in absolute alcohol 1:20; from this standard solution further solutions are prepared with physiological salt solution, and then tested for self-fixation. The dilution used was 1:3000.

2. Tuberculo-nastin. This is obtained from the residuum after the extraction of the fatty acids, by further extraction with ether. This ether extract contains the neutral fat and a high molecular fatty alcohol, and has been named tuberculo-nastin. As nastin is not soluble in water it is difficult to get a homologous emulsion. Much in his paper on nastin has recently described a method of obtaining an emulsion which is fit for complement-fixation reactions. He heats 1 g. nastin and 20 cc. absolute alcohol until a clear solution appears; to this he adds 80 cc. boiling distilled water, a milky emulsion is then formed, this is then further diluted with physiological salt solution.

After some time a deposit is formed. Then the emulsion has to be boiled again, until it becomes quite homogenous.

We used as antigen 1 cc. of a solution 1:5000.

3. Tubercle bacillus albumen has been prepared by Deycke and Much in the following manner:

The fatty substances of the tubercle bacillus were removed by benzoyl-chloride, the residuum contains nothing but albuminous bodies. For our purposes an emulsion with distilled water was prepared by rubbing it in the agate mortar: and the solution used was 1:2500.

Table VII.

Complement fixation of leper sera, against substances of the tubercle bacillus.

No. of serum	Serum and quantity	Tuberculin (Koch) 0,04	Tuberculo fatty acids 1:3000	Tuberculo nastin 1:5000	Tuberculo albumen 1:2500
1	Leper 0.2 cc.				
2	" 0.2 "	+++	+++	+—0	0
3	" 0.2 "	+++	+++	++	++
4	" 0.2 "	+++	0	0	0
5	" 0.2 "	+++	+++	0	0
6	" 0.2 "	+++	+++	0	0
7	" 0.2 "	+++—0	+++—0	0	0
8	" 0.1 "	+++	+++	+	+
9	" 0.2 "	+++—0	0	0	0
10	" 0.1 "		+	+	
11	" 0.2 "	+++	+++	0	+++—0
12	Tubercular 0.2 cc.	+++	+++	0	0
13	" 0.2 "	+++	+++	0	0

Table VII. a) Leper sera. The first of the antigen tests stated is tuberculin (Koch). It contains all the complement-fixing properties of the tubercle bacillus, and like the tubercle bacillus it will be seen that strong complement-fixation of nearly all the specific sera of leprosy is the main feature of the results of the reaction, a strong positive fixation being obtained in 7 cases of 9 tested.

Tuberculo fatty acids. With this substance as antigen, the complement-fixation is also strong and marked, the result shewn is that of 10 sera tested, 7 giving strong positive reaction.

Tuberculo nastin. The results here shew poor fixations, there being only 3 positive reactions of the 10 sera tested.

Tuberculo albumen. The results here shewn are of importance in our thinking, and it must be noted that only two instances give positive results in 9 tests.

b) Tuberculous sera. The reaction of tuberculin with these sera is in order, both sera shew strong complement-fixating bodies.

Tuberculo fatty acids. Give here exactly similar results with both sera as tuberculin.

Tuberculo-nastin and tuberculo-albumen. Both of these substances shew a negative reaction.

Our results of the reaction set out in Table VII may be stated thus:

Tuberculin (Koch)	positive reaction (after 24 hours)	77.7 %
Tuberculo fatty acid	" 24 "	70.0 "
" nastin	" 24 "	3.0 "
" albumen	" 24 "	2.2 "

It is obvious that the fixating bodies in this series of specific leper sera belong to the tuberculo-fatty acid group, and that the tuberculo-albumen is of little importance.

Deilmann, working with sera of tubercular cases and persons shewing anti-bodies of tuberculosis — immunized adults — in an

examination of a number of cases, used as his antigen the tubercle bacilli emulsion, tuberculin (Koch), and the substances of the tubercle bacillus. He obtained positive reactions as follows:

Tubercle bacillus emulsion	69.2	%
Tuberculin (Koch)	86.6	"
Tuberculo-nastin	56.2	"
Tuberculo fatty acid	15.0	"
" albumen	7.1	"

These results are in accord with our own. We can now state that the very important property in common with all these acid-fast organisms is their fatty substances, and the capacity for development by their presence in the serum of similar anti-bodies, which give so complete a complement-fixation not only with the specific micro-organism, but with the others of the acid-fast class. Our comparison scales under subhead III fully demonstrate our remarks.

We might remark that lepra-sera give more complement-fixation with the fatty acids (70 %) than with the neutral fat (3%) whereas sera with tubercle-immune-bodies contain a higher percentage of antibodies against nastin (56.2 %) than against the fatty acids (15 %). Perhaps this fact, after Much's opinion, explains the clinical efficiency of nastin with cases of leprosy, because it starts the production of the wanted fat-anti-bodies.

Our conclusions are that the specific complement-fixing substances of the tubercle bacillus are the same as those of the other related non-pathogenic organisms, vide introductory remarks IV.

Our results entitle us to add that 1) Both pathogenic and non-pathogenic acid-fast bacilli possess common properties. 2) That their thorough similarity,

- a) Morphologically,
- b) with regard to biological reactions.
- c) with regard to chemical reactions and consistence,

shew that these acid-fast organisms are of a common stock, and that their differences are due to the development of certain special qualities peculiar only to the individual organism.

### Part 3.

#### Quantitative complement-fixation.

In order to get further information we have tested some of the sera quantitatively. The results are shown in the following tables:

Table VIII. Quantitative complement-fixation of leper sera 3 and 5 (vide Table IV) against antigens of the acid-fast bacilli.

1. Serum 3. Positive reactions, it will be seen, have taken place with all the antigens, though tested against such weak dilutions of sera; but as we intend only to treat here with tuberculosis and leprosy bacillus, we call attention to the fixation of both organisms with a dilution of 0.01 cc. serum.

2. Serum 5. The results are completely negative with leprosy, but positive with tubercle bacillus. The negative reaction against leper bacilli is rather surprising, as the serum contains strong anti-bodies against tuberculous antigen. But we have to remember that the leper bacilli could not be tested in the same strength of solution as the other acid-fast bacilli (as already mentioned).



Table VIII.  
Quantitative complement fixation.

Serum (quantity)		Leper bacilli	Human tubercle bacilli	Bovine tubercle bacilli	Urine bacilli	Blind-worm bacilli	Timothy grass bacilli
		Emulsion 0.1	Emulsion 0.06	Emulsion 0.078	Emulsion 0.1	Emulsion 0.2	Emulsion 0.06
Leper serum 3							
Leper 0.2	cc.	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" 0.15	"	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" 0.1	"	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" 0.05	"	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" 0.025	"	+++	+++	+++	+++	++	+
" 0.01	"	+++	++	++	+—0	0	0
Leper serum 5							
Leper 0.2	cc.	0	+++	+++	+++	0	+++
" 0.15	"	0	+++	+++	+++	0	+++
" 0.1	"	0	+++	+++	+++	0	+++
" 0.05	"	0	+++	+++	+++	0	++
" 0.025	"	0	+++	+ + +	++	0	+—0
" 0.01	"	0	+	0	(+)	0	0

Table IX.  
Quantitative complement fixation.

Serum (quantity)		Tuberculin Koch	Tuberculo fatty acid	Tuberculo nastin	Tuberculo albumen
		0.04	1 : 3000	1 : 5000	0.04
Leper Serum 3.					
Leper 0.2	cc.	+++	+++	+++	++
" 0.15	"	+++	++	++	0
" 0.1	"	+++	++	+ + — 0	0
" 0.05	"	+++	+—0	0	0
" 0.025	"	++	0	0	0
" 0.01	"	0	0	0	0
Leper Serum 5.					
Leper 0.2	cc.	+++	0	0	0
" 0.15	"	+++	0	0	0
" 0.1	"	+++	0	0	0
" 0.05	"	+++	0	0	0
" 0.025	"	+—0	0	0	0
" 0.01	"	0	0	0	0

Table IX. Quantitative complement-fixation of the substances of the tubercle bacillus as antigen against leper sera.

Serum 3. a) Tuberculo-albumen has shewn only one positive reaction, and that with the usual amount of serum.

Tuberculo-nastin. This antigen was too weak as compared with the other substances. After the usual hour, positive results were shewn with 0.15 and 0.1, but both of these disappeared on standing.

Tuberculo fatty acid and tuberculin both shew interesting results:

Sera 5. The results throughout are negative.

Table X. Quantitative complement-fixation of leper nastin and the substances of the tubercle bacillus as anti-

gen against immunized serum (goat). These results are from experiments of Much and Leschke.

Table X.  
Quantitative complement fixation immunised serum (goat 1) against leper  
of nastin and tubercle bacilli substances.

Serum (quantity)	Nastin 1:750	Tuberculi nastin 1:5000	Tuberculo fatty acids 1:3000	Tuberculo albumen 1:2500
0.2 cc.	+++	+++	++	++(+)
0.1 "	+++	+++	++	+(+)
0.075 "	+++	+(+)	+	+(+)
0.05 "	++	trace	0	trace
0.025 "	+	0	0	0
0.01 "	+	0	0	0

With such weak dilutions of the serum, they obtained positive reactions with all the antigens. This furnishes ample proof of the value of the specific nature of the serum.

The value and importance of the discovery of Much that purely fatty substances are able to produce specific anti-bodies can never be over estimated. By this knowledge, the fixating properties of the specific serum of the acid-fast bacilli are now definitely known. It should also be of immense value in morbid conditions due to the presence of pathogenic acid-fast bacilli.

The work of Deycke in the discovery of nastin is also of immense value; this purely fatty substance having given ample proof of its high fixating qualities, as shewn in the table now under consideration.

These results at the same time show that nastin could be prepared in the same way from any other acid-fast bacillus, as the fatty substances of all these bacilli are so nearly related to one another.

Our conclusions are based on the following: 1) The results arrived at by Deycke when he found that inoculation of nastin into both leprous and tuberculous patients produced similar results (vide Introductory I). 2) The results of work in another field with the acid-fast bacilli, when there was found more corresponding relationship between leper and tubercle bacillus than between the other acid-fast organisms. 3) The results of our own work as set out in the tables, all of which substantiate and are in thorough agreement with 1. and 2.

#### Part 4.

##### Opsonic index.

Leper and tuberculous sera against *B. tubercle*, *B. leper*, *B. blind-worm*, *B. urine*, *B. timothy grass*.

Besides the complement-fixation method, we used the opsonic index for testing the immune bodies of specific sera of leper and tuberculosis.

The opsonic index has been determined by the methods used at the laboratory where our work took place, viz:

**Leucocytes:** Fresh human blood was taken with sodium citricum 10% and the plasma centrifugalised, to allow the leucocytes to fall to the bottom; the serum was next poured off, the leucocytes washed with physiological salt solution and again centrifugalised, this washing and centrifugalising being repeated about twice.

**Bacilli:** These were rubbed up in the agate mortar and emulsions made with physiological salt, and controlled by microscopic examination.

**Sera:** To each cc. of serum used, one drop of fresh complement was added so as to reactivate the serum.

The opsonic index was determined with the following sera, viz: 8 leper and 2 tubercular.

### I.

#### A. The non-pathogenic organisms.

**Timothy grass bacillus.** The opsonic index is high and fairly steady, and may be said to be within what is termed normal range, with the exception of sera Nos. IV, VII and XIII.

**Blind-worm bacilli.** Here phagocytosis is much the same as with Timothy grass bacilli; there is nothing of special note, but attention might be again drawn to Sera IV, VII and XIII.

**Urine bacilli.** So far as known, this bacillus is also non-pathogenic to warm blooded animals, and only largely increased doses intraperitoneally are fatal to guinea pigs. In this instance, a little interest appears to lie in the fact that: 1) The opsonic index is on the whole lower than that of the blind-worm bacillus and Timothy grass bacillus respectively. 2) That the differences between the several sera are more marked. Sera IV, VII and XIII, also give results worthy of consideration.

Table XI.

Opsonic index table.

Leprous and tuberculosis serum against the following bacilli: leper, tuberculosis, urine, blind-worm and Timothy grass.

No. of Serum	Sera	Tuberculosis bacilli		Leper bacilli		Urine bacilli		Blindworm bacilli		Timothy grass bacilli	
		C-F. <sup>1)</sup>	G-M. <sup>2)</sup>	C-F.	G-M.	C-F.	G-M.	C-F.	G-M.	C-F.	G-M.
I	Leper	0.23	0.35	2.7	2.3	0	0.58	0.61	0.66	0	0.73
II	"	0.4	0.52	2.2	2.0	0	0.67	0.69	0.66	0	0.86
III	"	0.2	0.29	3.0	3.5	0	0.58	0.8	0.64	0	0.8
IV	"	0.29	0.29	3.7	4.0	0	0.79	0.8	0.78	0	0.8
V	"	0.43	0.61	1.3	1.5	0	0.64	0.79	0.85	0	0.6
VII	"	0.85	1.1	1.9	1.7	0	0.41	0.79	0.9	0	0.53
VIII	"	0.29	0.31	2.1	2.1	0	0.44	0.58	0.64	0	0.8
IX	"	0.38	0.4	3.0	3.0	0	0.64	0.71	0.75	0	0.66
XII	Tuberculosis	0.9	0.9	0.5	0.8	0	0.47	0.76	0.65	0	0.66
XIII	"	0.02	2.0	0.3	0.5	0	0.64	0.56	0.55	0	0.86

#### B. The pathogenic organisms.

**Tubercle bacillus.** There is a material lowering or drop in the opsonic index when the sera are not specific for the tubercle micro-organism, and when specific as in the cases XIII and XII, there is at once a range within the laid-down normal area and also a considerable heightening of the index which at once demand consideration.

**Leper bacillus.** As in the case of the tubercular sera, there is not only the coming to normal, but the strong heightening that characterises the whole of these specific sera, viz., I to IX (of the

1) C-F. = Carbol-fuchsin.

2) G-M. = Gram-Much.

opsonic index table) with the leper bacillus, and we have here also what might be termed a turning of the table with the leper bacilli against tubercular sera, as seen with sera XII and XIII.

## II.

The sera. It is not intended to tread each serum separately in this small paper, neither can certain interesting facts be passed over without some comment. Nor do we lay claim to the establishment of new matter, but our sole desire is to express what is strikingly appreciable in the facts obtained from the specimens which have come under our notice.

It is difficult to select, but for the purposes of this thesis let us see the information that can be obtained from sera IV, VII and XIII.

Serum IV. Leper. Its opsonic index is the highest of the series when treated with its specific bacilli, and it maintains a very heightened index also with all the other non-pathogenic organisms, but when dealt with by another pathogenic specific micro-organism of the said group, viz., the tubercle bacillus, it immediately gives results in the direct opposite, that is, the opsonic index falls to about the lowest in the series of the leper sera. From this, and the behaviour of the other leper sera to the tubercle bacilli, the impression seems incontestable that the governing force of phagocytosis depends upon whether the serum is specific to the organism and also as to whether the organism is specifically pathogenic or not.

Serum VII. Leper. The opsonic index here is with the lowest of the leper group, thus differing in a great measure to the above serum (IV), but it is certainly worthy of note that in this instance where the index is so low as regards its own specific microorganism, the opsonic index is heightened to a marked extent when treated with the tubercle bacillus. As would be seen, it is in line within the normal area, and slightly lower than that for its own specific organism; it is also very noteworthy and can hardly be passed by without mention that serum V (also leper) has behaved in an exactly similar manner. With respect to the non-pathogenic organisms, there is nothing of interest to note.

Serum XIII. Tuberculosis. This is a specific serum of the tubercle microbe, and like the leper sera, its index is a long way heightened by its own specific micro-organism; and its drop towards the leper organism is distinct. Serum VII, also tubercular, shews the same characteristics as serum VIII in its behaviour with the leper bacillus. With the non-pathogenic organisms its tendency is somewhat within line with that of serum V., viz., to maintain a fair range.

Before turning away from this part of the work, we would like to add the very important fact that but for the Gram-Much manner of staining, much of the information arrived at could not have been obtained, as many of the organisms (whether from age or not) lose much of their fatty properties, and as the Ziehl-Neelsen method only brings out the micro-organism through its fatty properties, it is readily recognised of what excellent value is the Gram-Much.

Mention ought to be made that when the opsonic index could not be obtained with some of the specimens at our disposal with the Ziehl-Neelsen, the specimens were restained by the Gram-Much method and phagocytosis was readily shewn.

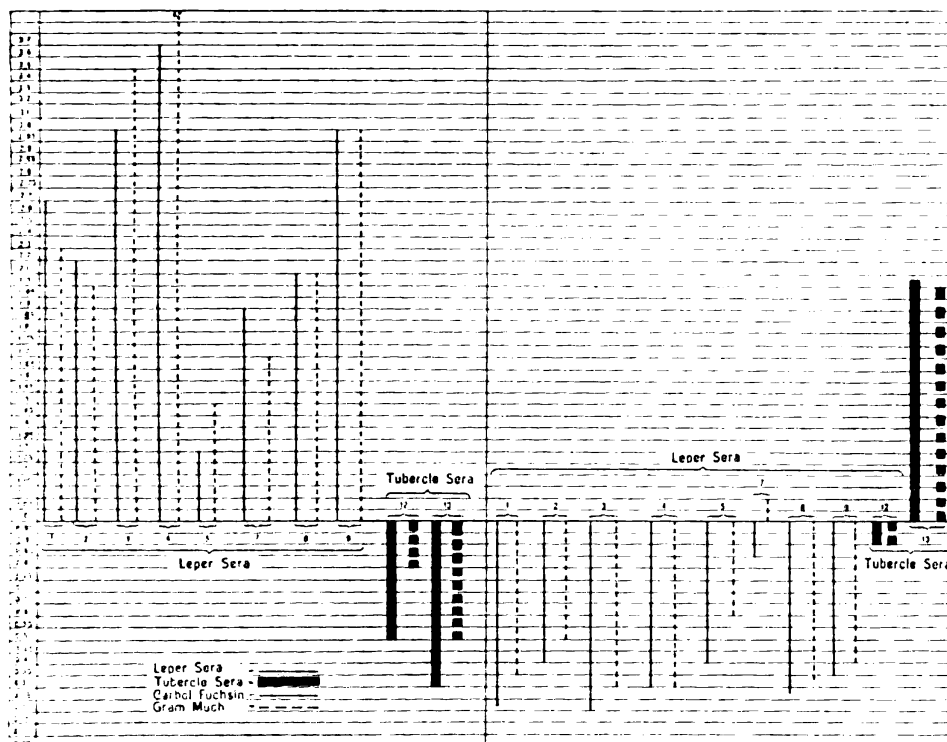
The opsonic index, in so far as we have been able to deal with it, is of value and points, as a help, to diagnosis in these diseases.

The writer has determined in other instances the opsonic index with immuned sera (tubercle) against the tubercle bacillus and the opsonic index with the sera of two immunized goats against the tubercle bacillus. In both of the above instances it was greatly increased, corresponding with the present results of human specific tuberculous serum against the tubercle bacillus and leper serum against the leper bacillus.

The remarkable difference between leper and tuberculosis sera is very clearly demonstrated by the opsonic chart.

The sera are represented thus:

Leper sera: ———  
 Tuberculous sera: —————  
 Carbol-fuchsin: ————  
 Gram-Much: - - - - -



We see that there is an entire reciprocity in the results obtained from leper and tuberculous sera; leprous sera having a very high opsonic index against leper bacilli, a very low one against tubercle bacilli, and vice-versa, tuberculous sera a very low opsonic index against leper bacilli, and a high one against their specific bacilli.

We only state these remarkable facts without drawing theoretical conclusions from them. However, we must remember that the circumstances of opsonic reaction are more difficult to explain than any other reactions of immune bodies, because not only a higher, but also a lower opsonic index proves the existence of specific immune bodies.

The apparent inconsistency that even a lower opsonic index is caused by specific anti-bodies has been demonstrated by many experiments of recent years, but a sufficient explanation is still wanted.

We therefore may say that in our cases the tubercle bacilli, as well as the leper bacilli, have given a specific reaction

with leper sera as well as with tuberculous sera. However, we state that there is a remarkable difference as well as a remarkable responsive action with regard to the increase and decrease respectively in the behaviour of these sera against these two micro-organisms.

#### General conclusions.

1. There are definite substances common to all acid-fast bacilli.
2. These substances are able to produce specific anti-bodies.
3. They belong to the fatty group (fatty acids, lipoids and neutral fats).
4. An organism that has been in contact with the virus of tuberculosis, not only gives a reaction against substances of the tubercle bacillus, but even against those of other pathogenic and non-pathogenic acid-fast bacilli with but quantitative differences.
5. In the same manner an organism under the influence of leper virus, not only reacts against the substances of leper bacilli, but also against substances of other acid-fast bacilli, chiefly those of tuberculosis.
6. The relationship of all acid-fast bacilli is established by the fact that their characteristic chemical bodies can be extracted from the bacilli, and these bodies have to be regarded as the property which these organisms possess in common.
7. With regard to leprosy, anti-bodies are produced more against the fatty acids and lipoids than against the neutral fat. This fact explains the therapeutic efficiency of nastin as causing the formation of fatty anti-bodies. With regard to tuberculosis, the formation of anti-bodies seems to be somewhat different from what we have seen with leprosy [Much and Leschke<sup>1</sup>].
8. The existence of the anti-bodies against neutral fatty bodies that have been discovered by Much is very important. They even exist in a much larger amount than Much himself at first thought.
9. All the non-pathogenic acid-fast bacilli show nearly normal opsonic index. With pathogenic acid-fast bacilli the opsonic index is altered. There exists a remarkable reciprocity in the behaviour of leper and tubercular sera against the bacilli of leprosy and tuberculosis.
10. All these reactions against acid-fast bacilli are to be regarded as entirely specific.

---

1) Beitr. z. Klin. d. Tuberkulose. Bd. 20. 1911.



*Nachdruck verboten.*

## Untersuchungen über die Tuberkulose der Milchkühe.

[Laboratorio batteriologico della Sanità Pubblica  
(Direktor: Prof. B. Gosio) Rom.]

Vorläufige Mitteilung.

Von Dr. Giuseppe Cosco, Coadiutore.

In dieser Mitteilung berichte ich in ihren Hauptzügen über die Resultate, die ich aus einer Reihe von Untersuchungen erhalten habe, welche feststellen sollten, auf welchen Wegen und in welcher Weise die Ausscheidung des Kochschen Bacillus aus dem Körper der an Tuberkulose leidenden Milchkühe vor sich geht.

Ich füge gleich hinzu, daß bei der Anordnung dieser Untersuchungen einer der hauptsächlichsten Zwecke darin bestand, vermittelst neuer Tatsachen einen Beitrag zu liefern zu der seit langer Zeit besprochenen, aber noch nicht entschiedenen Frage, die sich auf die verschiedenen Wege bezieht, auf denen der Bacillus der Tuberkulose in die Milch der Kühe gelangen kann.

Ich habe mit Materialien aus 9 Milchkühen experimentiert, bei denen die Krankheit mehr oder weniger vorgeschritten und verschieden lokalisiert war. Es ist jedoch hervorzuheben, daß sich bei der klinischen Untersuchung keine derselben als an tuberkulöser Lokalisation des Euters leidend erwiesen hat.

Die verschiedenen, aus jeder Kuh entnommenen Materialien waren folgende:

a) die aseptisch aus dem Innern des Euters gezogene Milch<sup>1)</sup>;

1) Bei den zwei ersten Kühen wurde die Milch nicht aus dem Innern des Euters gezogen, sondern gemolken, nachdem eine Reihe von Operationen vorgenommen war, die gegen Verunreinigungen aus dem äußeren Medium schützen sollten.

Das Verfahren war das folgende: Es wurde damit begonnen, die hinteren Beine der Kühe bis zu ihrer Verbindung mit dem Bauche mit zwei Binden zu umhüllen, die mit einer antiseptischen Lösung angefeuchtet waren. Ferner wurde die Oberfläche des Bauches mit einer sterilisierten Bauchbinde von grober und dichter Leinwand bedeckt, in welcher sich vier Oeffnungen befanden, um die Zitzen durchzulassen.

Vor Anlegung dieser Bauchbinde wurde die Haut des Bauches so gut als möglich gereinigt, dann wurden die Zitzen sorgfältig von Fett befreit, gewaschen und desinfiziert, indem man dafür sorgte, den kleinen Ring von Fett und Schmutz, der sich rings um die Mündung des Milchganges zu bilden pflegt, zu entfernen.

Die Hände der Person, der das Melken übertragen war, wurden gleichfalls von Schmutz befreit, gewaschen und sorgfältig desinfiziert.

Die Milch, welche in den ersten Strahlen spritzte, wurde nicht aufgesammelt, dagegen alle diejenige, die nachher herauskam, bis zur völligen Entleerung des Euters. Ein großes Gefäß von Glas mit ziemlich enger Oeffnung, das vorher sterilisiert war, diente zur Aufsammlung der Milch.

Dies langwierige und mühsame Verfahren wurde sobald als möglich aufgegeben und ein höchst einfacher Apparat angewandt, der vortreffliche Dienste leistete zur aseptischen Ausziehung der Milch aus den andern 7 Kühen.

Dieser Apparat besteht hauptsächlich aus einem kleinen, ungefähr 9 cm langen und 2,5 mm breiten Katheter von Metall, der vermittelst eines Gummiröhrchens mit einer großen gläsernen Flasche in Verbindung steht. Die Flasche trug oben ein mit Baumwolle angefülltes Röhrchen, das dazu diente, die im Gefäß enthaltene Luft entweichen zu lassen, während die Milch in dasselbe einfloß.

Der ganze Apparat wurde vor dem Gebrauch im Autoklaven sterilisiert.

Vor der Ausziehung der Milch wurden die Zitzen der Kuh desinfiziert, ebenso wie die Hände der Person, die die Operation ausführen sollte, und die ersten Kubikzenti-

- b) die auf gewöhnliche Weise (nach Art der Kuhhirten) gemolkene und in sterilisierten Gefäßen aufgesammelte Milch;
- c) der im Innern des Mundes gesammelte Geifer<sup>1)</sup>;
- d) der mit einem metallischen sterilisierten Katheter aus der Blase gezogene Urin;
- e) die direkt im Rektum gesammelten Exkreme.

Jedes der genannten Materialien wurde jedesmal in relativ großen Mengen und auf viele Tage (von einem Minimum von 6 Tagen bis zu einem Maximum von 36 Tagen) einem kleinen Schwein verabreicht, das kaum entwöhnt und der Tuberkulinprobe unterzogen war (Kutanreaktion, Conjunctivalreaktion).

Die Milch wurde zu trinken gegeben, während der Geifer, der Urin und der Kot mit dem schon durch die Hitze sterilisierten Futter verabreicht wurden.

Zugleich wurden dieselben Materialien (mit Ausnahme der Exkreme) Meerschweinchen inokuliert.

Jede Inokulation wurde gemacht:

- a) entweder mit 6 ccm Geifer,
- b) oder mit 6 ccm Rahm,
- c) oder mit dem Bodensatz der Zentrifugation mehrerer Liter derselben Milch, von der der Rahm entnommen war,
- d) oder mit dem Bodensatz der Zentrifugation von ungefähr 1 Liter Urin.

Es wurde eine große elektrische Zentrifuge angewandt, die in der Minute 4000 Drehungen machte und jede Zentrifugation eine halbe Stunde dauerte.

Alle Kühe wurden, nachdem sie während einer gewissen Zeit die für die Ausführung der Experimente erforderlichen Materialien geliefert hatten, getötet und einer genauen Autopsie unterworfen.

Um eine ziemlich klare Vorstellung von den von mir gewonnenen Resultaten zu geben, füge ich eine kleine Tabelle bei, in der der Ausgang der Experimente verzeichnet ist, die mit den von jeder Kuh entnommenen Materialien ausgeführt wurden und worin die anatomischen und pathologischen Beobachtungen, die bei der Nekroskopie der Kühe gemacht wurden, kurz zusammengefaßt sind, indem ich bemerke, daß ich der genauen Untersuchung jedes Euters besondere Aufmerksamkeit geschenkt habe; es war mir jedoch nicht möglich, makroskopisch irgendeine tuberkulöse Verletzung in derselben zu entdecken.

Den negativen Ausgang der Experimente habe ich mit dem Zeichen —, den positiven mit dem Zeichen + angedeutet.

meter der gemolkene Milch wurden nicht aufgesammelt. Nachdem darauf der kleine Katheter mit sterilisiertem Oel bestrichen war, wurde er behutsam in den Kanal der Zitze eingeführt und aufgehalten, wenn man sah, daß die Milch in die Flasche einströmte; die Milch wurde aber aufgesammelt, bis sie nicht mehr floß.

1) Ich beabsichtigte, auch den Schleim der Nase aufzusammeln, aber dieser war entweder fast nie vorhanden oder in so geringer Menge, daß er nicht mit Vorteil zu den Untersuchungen angewandt werden konnte.

Uebrigens beweist der Nachweis des Tuberkelbacillus im Nasenschleim nicht absolut, daß die Ausscheidung dieses Keimes auch auf dem Wege der Nase stattfindet, denn er kann von außen eindringen, sei es durch direkte Berührung der Oeffnungen der Nase mit infiziertem Material, sei es durch Einatmung von mit Bacillen enthaltendem Staub angefüllter Luft.

Ebenso erklärt sich die Gegenwart des Kochschen Bacillus im Munde in sehr vielen Fällen daraus, daß infizierte Nahrungsmittel und an Keimen reiche Luft in den Mund eingedrungen sind.

Nummer der Kuh	Aseptisch gesammelte Milch	Auf gewöhnliche Weise gemolk. Milch	Geifer	Urin	Kot	Mikroskopischer Befund
I	—	—	—	—	—	Sehr wenige graue Tuberkeln an einer peribronchialen Lymphdrüse und an der linken Lunge.
II	—	—	+	—	+	Weit fortgeschrittene Tuberkulose beider Lungen.
III	—	+	—	—	+	Tuberkulöse Geschwüre am Blinddarm; Tuberkeln an den mesenterialen Lymphdrüsen.
IV	—	+	—	—	+	Fortgeschrittene Tuberkulose, namentlich d. rechten Lunge.
V	—	+	—	—	+	Nicht sehr fortgeschrittene Tuberkulose der rechten Lunge.
VI	+	+	+	—	+	Sehr fortgeschrittene Tuberkulose beider Lungen, die sich auch auf die Rippenpleura erstreckt.
VII	—	+	—	—	+	Fortgeschrittene Tuberkulose beider Lungen.
VIII	—	—	—	—	—	Tuberkulose der peribronchialen Lymphdrüsen; sehr seltene Tuberkeln und zwei kleine lappige graue Herde an der linken Lunge.
IX	+	+	—	—	+	Sehr fortgeschrittene Tuberkulose der Lungen; Tuberkulose der Leber, der Milz und der mesenterialen Lymphdrüsen usw.
Im ganzen	+ 2 — 7	6 3	2 7	0 9	7 2	

Nach dem, was ich oben kurz berichtet habe, und nach dem ganzen Komplex meiner Untersuchungen lassen sich die folgenden hauptsächlichen Schlüsse ziehen:

1) Die Uebertragung der Tuberkulose unter den Rindern findet in den meisten Fällen vermittelt des Kotes statt, der den spezifischen lebenden und virulenten Bacillus enthält.

Dieser befindet sich im Kot, sei es weil er aus tuberkulösen Verletzungen ausgeschieden ist, die längs dem Verdauungskanal vorhanden sind, sei es weil er aus den Lungen vermittelt des Auswurfs kommt, den die Rinder fast ganz zu verschlucken pflegen, oder sei es schließlich, weil er zugleich aus Lokalisationen herrührt, die in dem Atmungs- und Verdauungsapparat existieren.

Dieser im Stalle ausgebreitete Kot bildet die größte Infektionsquelle der Krankheit. Indem er die Spreu, das Futter und die Kräuter beschmutzt, gelangt er mit den Nahrungsmitteln in den Verdauungsapparat der Tiere und dringt in ihre Lungen ein, wenn er, getrocknet und pulverisiert, in die Luft aufsteigt und mit dieser eingeatmet wird.

2) Der Tuberkelbacillus kann in der Milch tuberkulöser Kühe, aber mit Eutern von durchaus gesundem Aussehen vorkommen, auch wenn die Milch aus dem Innern der Euterdrüse ausgezogen wird, bei Anwendung aller Vorsichtsmaßregeln, um jede von außen kommende Verunreinigung zu vermeiden.

Die Verfasser, welche diese Tatsache leugnen, behaupten, daß der Tuberkelbacillus in der direkt aus der Euterdrüse gezogenen Milch nicht vorkommen kann ohne das Vorhandensein einer tuberkulösen Lokalisation

im Euter, einer Lokalisation, die, wenn sie im Anfangsstadium ist, nur mittelst mikroskopischer Untersuchung festgestellt werden könne.

Da hierzu außerordentlich viel Zeit und Arbeit erforderlich wären, weil man mit dem Mikrotom ganze Euter sektionieren, die Sektionen färben und eine nach der anderen mikroskopisch untersuchen müßte, so wäre es nicht leicht, auf diesem Wege eine definitive Lösung der Frage herbeizuführen.

Somit bleibt nichts anderes übrig, als sich auf die genaueste makroskopische Untersuchung zu beschränken.

Meinerseits kann ich versichern, die Euter der Kühe No. VI und IX, deren Milch den Kochschen Bacillus enthielt, auch wenn sie aseptisch aus dem Innern der Drüse gezogen war, in ganz kleine Stücke zerschnitten und mit minutiöser Sorgfalt untersucht zu haben, ohne daß es mir gelungen ist, in denselben irgendeine tuberkulöse Verletzung zu entdecken. Ich füge hinzu, daß eine Emulsion in sterilisiertem Wasser der hinter dem Euter gelegenen, in feinen Brei verwandelten Ganglien der genannten Kühe, den Meerschweinchen inokuliert, ohne Wirkung geblieben ist.

Vielleicht ist es nicht unzweckmäßig, hervorzuheben, daß in den beiden erwähnten Fällen es sich bei der Nekroskopie herausstellte, daß die Kühe an einer sehr schweren Tuberkulose gelitten hatten.

3) Das häufige Vorkommen des Kochschen Bacillus in der auf gewöhnliche Weise gemolkenen Milch von tuberkulösen Kühen ohne Lokalisationen im Euter (Milch, die sich im Gegenteil als frei von Bacillen erwies, wenn sie aseptisch mit dem Katheter aus dem Innern des Euters gezogen war) ist den fäkalen Verunreinigungen zuzuschreiben, die während des Melkens stattfinden.

Es ist leicht, sich vorzustellen, wie solche Verunreinigungen entstehen. Kleine Stücke von Bacillen enthaltenden Exkrementen, die an den Zitzen, den Eutern und an der Haut des Bauches haften (und oft auch an den Händen der mit dem Melken beschäftigten Personen), lösen sich ab und fallen während des Melkens in den Eimer, in welchem die Milch aufgesammelt wird.

Die Eimer selbst, wenn sie unbedeckt im Stall gelassen werden, können vor und nach der Aufsammlung der Milch andere Mengen von Bacillen mit dem Staube aufnehmen, der sich in ihnen niederschlägt und aus dem getrockneten und in die Luft aufgestiegenen Kot gebildet ist.

Außerdem rührt eine andere Art von Verunreinigung davon her, daß während des Melkens die Kühe, namentlich wenn sie von den Fliegen belästigt werden, fortwährend den Schwanz bewegen, was zur Folge hat, daß, wenn dieser mit Kot beschmutzt ist, ein Teil davon in den Eimer fällt<sup>1)</sup>.

1) In meinen Experimenten ist es einmal vorgekommen, daß der Tuberkelbacillus, obwohl er im Kot der Kuh (No. II) vorhanden war, sich in der auf gewöhnliche Weise

4) Die Ausscheidung des Tuberkelbacillus auf dem Wege des Mundes muß in sehr geringen Proportionen vorkommen, und jedenfalls kann sie nicht verglichen werden mit der großen Verbreitung desselben durch den Kot.

Wie ich schon bemerkt habe, kann die Gegenwart des genannten Mikroorganismus in der Mundhöhle fast ausschließlich von der Einführung verunreinigter Nahrungsmittel und einer Bacillen enthaltenden staubreichen Luft herrühren.

5) Die Ausscheidung des Tuberkelbacillus mit dem Urin ließ sich in meinen Versuchen nie nachweisen; aber es ist selbstverständlich, daß die Tuberkelbacillen vorhanden sein können in Fällen, in denen tuberkulöse Lokalisationen im Harn- und Genitalapparat existieren.

6) Da ein von geschlossener Tuberkulose affiziertes Rind auf keinem Wege spezifische Bacillen ausscheidet, ist es natürlich, daß sein Zusammenleben mit anderen Rindern in demselben Lokal unschädlich bleibt, bis mit dem Fortschreiten der Krankheit die Tuberkelbacillen einen Ausweg nach außen finden.

*Nachdruck verboten.*

## Leukocyteinschlüsse bei Scharlach.

[Aus dem pathologischen Institut der Universität Kiel.]

Von Prof. Dr. Döhle, Abteilungsvorsteher am Institut.

Mit 6 Figuren.

Bei der Untersuchung von Blutausstrichen Scharlachkranker habe ich seit rund einem Jahre in einigen 30 Fällen fast regelmäßig Einschlüsse in Leukocyten gefunden, wie sie, soweit ich sehen kann, bei Scharlach noch nicht beschrieben sind.

Ob sie immer bei Scharlach vorkommen, innerhalb welcher Zeit im Verlauf der Erkrankung sie auftreten, welche Bedeutung ihnen vielleicht auch in der noch vollkommen unbekannten Aetiologie des Scharlach zukommt, und ob sie endlich von ähnlichen, bei anderen Krankheiten gefundenen zu unterscheiden sind? Das festzustellen muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, die systematischer und bequemer an klinischen Instituten angestellt werden können als von mir, da das Material zur Untersuchung dort leichter zu beschaffen und im Verlauf der Erkrankung zu verfolgen ist.

Die Präparate, welche dieser Mitteilung zugrunde liegen, habe ich zum größten Teil von Herrn Dr. Edens, Privatdozenten in München,

gemolkenen Milch derselben nicht vorfand. Es ist zu bemerken, daß die erwähnte Kuh mir nur für kurze Zeit Material lieferte, da sie am 11. Tage nach Beginn des Experiments gestorben ist.

Wenn das Tier am Leben geblieben wäre und das Experiment sich hätte verlängern lassen, so würde wahrscheinlich das Zusammentreffen aller jener Umstände nicht ausgeblieben sein, die in der Regel den Uebergang des Bacillus in die Milch vermittelt kleiner Teile von durch den Tuberkelbacillus infizierten Exkrementen zu begünstigen pflegen.

und Herrn Dr. Richter, derzeit Assistent der medizinischen Klinik in Kiel, erhalten. Beiden Herren sage ich auch an dieser Stelle meinen besten Dank.

Das Verfahren, mit dem ich die Einschlüsse gefunden habe, ist folgendes:

Fixierung der lufttrockenen Ausstriche mit 96-proz. Alkohol oder Sublimatalkohol. Färbung in einem Gemisch von G. Hoppe-Seylers Reagens auf Zucker (Orthonitrophenylpropionsäure in alkalischer Lösung) 2 Teile auf 100 Teile dest. Wasser und 6 Teile Michaelis-Azurblau. Dauer der Färbung 6—24 Stunden. Abspülen mit Wasser.

Eine etwas umständlichere, aber wenn sie gelingt, bessere Methode, weil ein Farbenunterschied zwischen dem Blau der Kerne und der Einschlüsse derart vorhanden ist, daß die Kerne dunkler blau als die Einschlüsse gefärbt sind, ist die:

Färbung der in Alkohol fixierten Ausstriche in einem Gemisch von Orseille in saurer Lösung und saurem Hämatoxylin nach Ehrlich, zu gleichen Teilen, mehrere Stunden, differenzieren in Salzsäurealkohol (1-proz. Salzsäure zu 60-proz. Alkohol). Abspülen in Leitungswasser, nachfärben mit der oben angegebenen Mischung 24 Stunden; abspülen mit Wasser oder wenn eine Ueberfärbung stattgefunden hat, in Alkohol, eventuell dünnem Salzsäurealkohol.

Im weiteren Verlauf der Untersuchung hat sich der Zusatz von dem Reagens auf Zucker unnötig erwiesen, da die Färbung mit Michaelis-Azurblau, 6:100 Wasser, fast ebensogute Präparate liefert; ich führe aber die Methode an, weil die Photographien, die ich beifüge, nach so gefärbten Präparaten hergestellt sind.

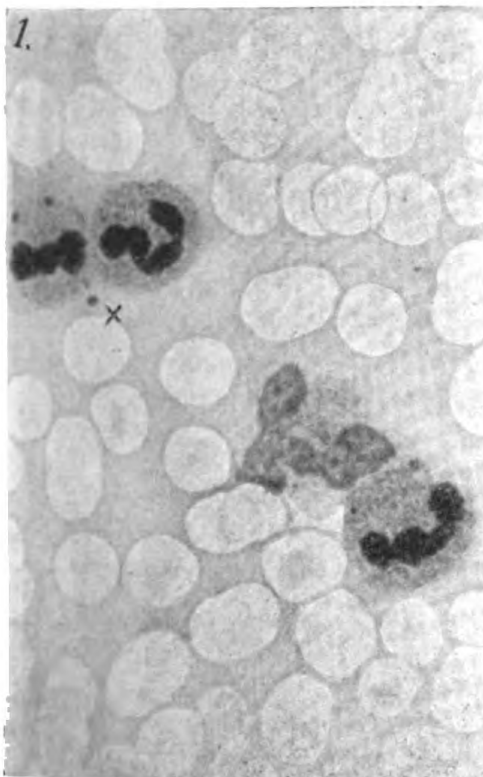
In so behandelten Präparaten finden sich in dem Protoplasma der polymorphkernigen Leukocyten, das wenig oder gar nicht gefärbt ist, blau gefärbte Einschlüsse.

Eine Verwechselung der Einschlüsse mit kleinsten Kernläppchen, die manchmal nur mit einem kaum sichtbaren Fädchen mit dem übrigen Kern verbunden sind, ist möglich; daß es sich aber darum nicht handeln kann, ergibt sich daraus, daß einmal diese Einschlüsse nirgends Verbindungen mit dem Kerne erkennen lassen, daß sie sich besonders bei der Doppelfärbung anders als der Kern färben, und daß endlich mit Methylgrün-Pyronin eine Doppelfärbung derart zu erzielen ist, daß die Kerne mattgrün und die Einschlüsse mattrot gefärbt sind. Ich habe diese letztere Färbung, nachdem mir die Abhandlungen von W. Wechselmann und Hirschfeld (1) und weiterhin May (2), die ähnliche Einschlüsse beschrieben haben, zur Kenntnis gekommen waren, nur noch an 10 Präparaten ausführen können; aber bei der Regelmäßigkeit, mit der in diesen die Doppelfärbung auftrat, zweifle ich nicht daran, daß sie sich auch weiterhin im Scharlachblut wird finden lassen.

Die Zahl der Leukocyten, die solche Einschlüsse zeigen, ist wechselnd, in dem einen Falle finden sie sich reichlich, in dem anderen sehr spärlich. Die Zahl der Einschlüsse in den einzelnen Blutkörperchen ist ebenfalls verschieden; in der Regel sieht man nur 1 oder 2, manchmal auch mehrere, bis zu 6 in einer Zelle. Auch die Form der Einschlüsse ist verschieden. Es sind zum Teil rundliche oder ovale Körner von etwas wechselnder Größe, die manchmal zu zweit beieinander liegen, wobei die einander zugekehrten Seiten gewöhnlich abgeplattet sind; weiterhin sieht man etwas größere stäbchenförmige Gebilde, die an den Enden etwas zugespitzt sein können; auch hier liegen nicht sehr selten zwei in der

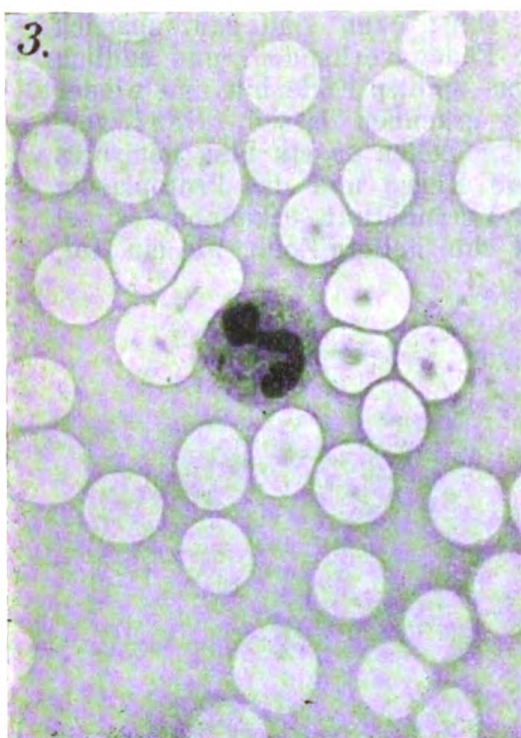


Längsrichtung nebeneinander, und häufig scheint dann das eine etwas spitzer an einem Ende und länger zu sein; dann sind ganz spärlich leicht gewundene, kurze, ziemlich dicke Fäden vorhanden, und endlich sieht man birnförmige Körper, die an dem spitzen Ende hin und wieder einen feinsten fädchenförmigen Fortsatz erkennen lassen. Ganz vereinzelt habe ich auch mal außerhalb der Zellen so ein blau gefärbtes Korn oder Doppelstäbchen gesehen. Die Kerne und das Protoplasma der befallenen Leukocyten lassen keine Veränderung erkennen, es sei denn, daß um die Einschlüsse manchmal eine hellere Zone, wie ein Hof, vorhanden ist.



Ueber Größe und Form geben die beigegebenen Photographieen wohl am einfachsten Aufschluß. Sie sind bezüglich der Formverschiedenheiten allerdings nicht ganz erschöpfend, es ist wohl aber kaum nötig, noch weitere hinzuzufügen, da in den nach obigen Angaben behandelten Präparaten die Einschlüsse leicht zu sehen sind. Die Photographieen stammen zum Teil schon aus dem Januar dieses Jahres, wo sie von Herrn Martini, Vertreter der Firma Zeiss, in Hamburg angefertigt sind.

Innerhalb welcher Zeit im Verlauf der Krankheit die Untersuchung gemacht wird, scheint zur Erzielung eines positiven Resultates nicht gleichgültig. Viel Erfahrung steht mir darüber allerdings nicht zu, aber in zwei Fällen, in denen ich das Blut vom 2. resp. 3. Tage der Erkrankung bis zum 4. resp. 6. Tage untersuchen konnte, fanden sich die Einschlüsse in den ersten Tagen reichlich, am 5. Tage nur sehr spärlich, so daß man sie kaum beachtet hätte, wenn man zufällig zuerst ein solches Präparat in die Hände bekommen hätte; und am 6. Tage gar nicht mehr. So mögen vielleicht auch die paar Ausstriche, die von



4.

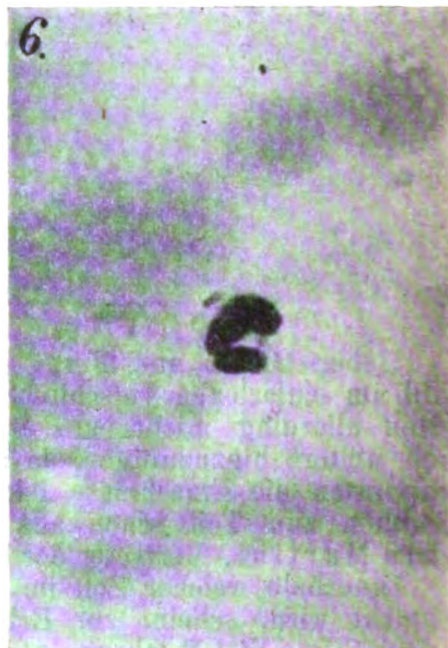
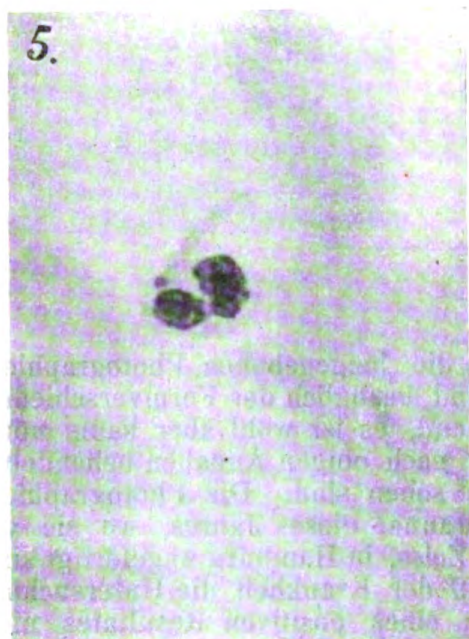
**Figurenerklärung.**

Fig. 1 zeigt außer drei Leukocyten mit Einschlüssen bei x ein frei gelegenes, den Einschlüssen gleiches Korn.

Die übrigen zeigen je einen Leukocyten mit einem oder mehreren Einschlüssen von verschiedener Form.

In Fig. 2 sind 5 nahe an dem einen Rande des Leukocyten, in 3 und 4 je 2 und in 5 und 6 je 1 Einschuß vorhanden.

Scharlachkranken sein sollten und in denen ich die Einschlüsse nicht fand, von solch älteren Erkrankungen stammen. In ein paar Fällen, in denen mir Blut von Menschen, die schon vor Wochen Scharlach überstanden hatten, zur Untersuchung geschickt wurde, habe ich nichts finden können. Es scheint danach, daß am geeignetsten zum Nachweise der Einschlüsse die Zeit kurz nach dem Ausbruch des Exanthems ist. Zum Vergleich habe ich das Blut von zahlreichen anderen Kranken untersucht und nur in 3 Fällen habe ich Ähnliches gesehen. In einem Falle, in dem das Blut von einem Pneumoniekranken stammen sollte; möglich, daß hier eine Verwechslung mit Scharlachpräparaten vorgekommen ist, da ich sie in Blut von anderen Pneumoniekranken, das ich daraufhin untersucht habe, nicht finden konnte. Dann in 2 Fällen von Krebs, in dem einen Fall, von dem ich nichts weiter weiß, als daß das Blut von einem Krebskranken stammte, schienen sie mir durchweg kleiner und weniger vielgestaltig zu sein, in dem anderen aber, das von einem Manne stammte, der eine alte Lues hatte und an einem Pankreascarcinom (wie sich bei der Sektion ergab) starb, waren sie nicht von den bei Scharlach gefundenen zu unterscheiden. In diesem Falle färbten sich die Einschlüsse mit Methylengrün-Pyronin leuchtend rot.

In der Literatur habe ich drei Veröffentlichungen gefunden, die ähnliche Einschlüsse in weißen Blutzellen beschreiben. W. Wechselmann und H. Hirschfeld, l. c., beschrieben in einem Falle von akuter myeloider makrolymphocytärer Leukämie Zelleinschlüsse. Sie fanden sie hauptsächlich in polymorphkernigen Leukocyten, aber auch in mononukleären Zellen. Nach der Beschreibung und den beigegebenen Abbildungen scheinen sie mir durchweg größer und regelmäßiger gestaltet zu sein als die, die ich bei Scharlach gefunden habe und außerdem fast regelmäßig von einem hellen Hof umgeben. Ähnlich scheinen mir allerdings die zu sein, die May l. c. in einem Falle von Oedem aus unbekannter Ursache beschreibt. Er findet sie aber nicht nur in polymorphkernigen, sondern auch in eosinophilen Leukocyten und in Mastzellen.

Politzer (3) beschreibt bei einem Patienten mit Anämie, Milz-, Lebertumor und Leukopenie in den großen mononukleären Leukocyten Einschlüsse von variabler Form, die sich mit Giemsa intensiv rot färben und amöboide Bewegungen zeigen; er sieht sie als Kernabspaltungen an. Abgesehen davon, daß sich die Einschlüsse nicht wie bei Scharlach in den polymorphkernigen Leukocyten finden, habe ich mit Giemsa keine besondere Färbung in meinen Fällen erzielen, und Verbindungen mit dem Kerne habe ich nicht feststellen können.

Zelleinschlüsse bei Scharlach sind in letzter Zeit von Bernhardt (4) beschrieben worden. Er fand solche in Zellen von Lymphdrüsen und Nieren. Nach der Beschreibung haben sie keine Ähnlichkeit mit den von mir im Blute gefundenen. In Ausstrichen von Lymphdrüsen aus der Inguinalgegend Scharlachkranker, die ich von früher her noch hatte, ließen sich jedoch in großen Zellen, die sich im ganzen schlecht färbten, und auch außer ihnen, mit der von mir benutzten Färbung Häufchen roter Körner färben, die eine große Ähnlichkeit mit den von Bernhardt beschriebenen zu haben scheinen.

Höfer (5) findet Einschlüsse in Zellen von Milz, Lymphdrüsen und Schleimhäuten von an Scharlach Verstorbenen. Da es sich um Befunde in Organzellen und nicht in Leukocyten wie bei mir handelt, scheint es mir vorläufig überflüssig zu sein, darauf näher einzugehen.

Durch Uebertragung von Blut Scharlachkranker auf weiße Mäuse, Kaninchen, Schweine ist es mir nicht gelungen, diese Einschlüsse bei den Tieren zu erzielen. Affen standen mir nicht zur Verfügung.

#### Literaturverzeichnis.

- 1) Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 66.
- 2) Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 96.
- 3) Dtsche med. Wochenschr. 1908. p. 1455.
- 4) Dtsche med. Wochenschr. 1911. No. 17 u. 23.
- 5) Dtsche med. Wochenschr. 1911. No. 23.

*Nachdruck verboten.*

### Zur Artenfrage der Streptokokken.

[Aus der I. medizinischen Klinik der Universität München (Geheimrat Prof. Dr. Ritter v. Bauer).]

Von **Emil Le Blanc.**

Die günstigen Erfolge, welche die moderne Serumbehandlung der Diphtherie gezeitigt hat, ließen auch die Herstellung und Anwendung eines Antistreptokokkenserums wünschenswert und aussichtsvoll erscheinen. Für die Gewinnung eines therapeutisch wirksamen Antistreptokokkenserums war aber die Beantwortung einer schon lange Jahre erörterten Frage von einschneidender Bedeutung, ob nämlich alle Streptokokken derselben Art angehören, also eine „Arteinheit“ besteht, oder ob es unter den Streptokokken einzelne mit besonderer Spezifität für die Erkrankungen des Menschen ausgestattete Arten gibt. Letzteres würde dann für eine „Artvielheit“ sprechen. Sonderbar war nämlich die Tatsache, daß man bei dem Studium des ätiologischen Faktors von klinisch scharf getrennten, wohl umschriebenen Krankheitsbildern, wie Erysipel, Scharlach, Angina, Gelenkrheumatismus, immer nur wieder den *Streptococcus pyogenes* fand, den man schon als den Erreger von Sepsis und eitrigen Phlegmonen identifiziert hatte. Um nun der Forderung der unbedingten Spezifität, die Robert Koch für den ätiologischen Zusammenhang zwischen Mikroorganismus und Krankheit aufgestellt hat, gerecht werden zu können, hat man sich bis heute eifrig bemüht, für die bei klinisch verschiedenen Erkrankungen gefundenen Streptokokken auch besondere pathologische, kulturelle und biologische Unterschiede aufzufinden. Man wollte also einzelne Arten so scharf charakterisieren, daß sie als spezifische Erreger für bestimmte Krankheiten angesehen werden konnten. Andererseits aber durfte man bei Feststellung von Artvielheit der Streptokokken einen therapeutischen Erfolg nur von einem polyvalenten Antiserum erhoffen, während Arteinheit der Streptokokken die Herstellung eines monovalenten Heilserums rechtfertigen würde.

So hat man nun zu Anfang gerade darin, daß der eine *Streptococcus* ein Erysipel, der andere einen Gelenkrheumatismus hervorruft, eine für den bestimmten Stamm spezifische Arteigentümlichkeit erblicken wollen und je nach dem erzeugten Krankheitsbilde einzelne Arten unterscheiden zu können geglaubt.

Die Versuche Petruschkys erwiesen jedoch, wie die Erregung verschiedener Krankheitsbilder von der Versuchsanordnung, also äußeren Verhältnissen, und nicht von bestimmten Arteigentümlichkeiten eines *Streptococcus* abhängig sein kann.

Die verschiedene Länge der von den einzelnen Streptokokken gebildeten Ketten hat man dann als geeignet zur Differenzierung einzelner Arten erachtet. Allein die



Bildung von langen Ketten bei saprophytären Streptokokken, das vereinzelte Vorkommen von kurzen und langen Ketten bei demselben Stamm, ferner die Beobachtung, daß sich die Kettenlänge durch wechselnde Zusammensetzung des Nährsubstrates beliebig variieren läßt, muß eine Arzteilung in *Streptococcus brevis* und *longus*, wie sie Lingelsheim heute noch anwendet, als unberechtigt erscheinen lassen. Das verschiedene Verhalten zu Sauerstoff und Farbstoffen, die zeitweilige Kapselbildung, das Vermögen, Gelatine zu verflüssigen, ihre Virulenz für bestimmte Tiere, hat man als charakteristische Eigenschaften einzelner Streptokokken angegeben und mit ihrer Pathogenität in Zusammenhang gebracht, ohne daß diese Angaben genaueren Nachprüfungen standgehalten hätten.

Die Fortschritte der Immunitätsforschung und die Verfeinerung der serologischen Technik ließen selbstverständlich auch die biologischen Methoden zur Entscheidung der Artenheit oder Vielheit der Streptokokken zur Anwendung kommen. Vor allem war es die agglutinierende Wirkung künstlich hergestellter Immunsera, die den Gegenstand ausgedehnter Untersuchungen bildete. Während sich nun die agglutinierende Kraft der Seren einzelner Forscher auf alle geprüften Stämme ausdehnte, blieb diese in den Versuchen anderer Autoren immer nur auf den Stamm beschränkt, der zur Herstellung des agglutinierenden Serums benutzt worden war. Diese sich direkt widersprechenden Ergebnisse und die damit bewiesene Wertlosigkeit des Agglutinationsverfahrens für die Entscheidung der Artenfrage der Streptokokken ist durch die leichte Spontanagglutination der Streptokokken bedingt.

Die erwähnte exakte Herstellung agglutinierender Seren und die genauere Prüfung ihrer Wirkungsweise, sowie die erste Gewinnung eines praktisch aussichtsvollen künstlichen Immunserums ist erst durch die Arbeiten Schottmüllers möglich geworden. Schottmüller fand in dem Blutagar Nährboden, den er durch Mischung von 2 ccm defibrinierten Menschenblutes mit 5 ccm Agar herstellt, ein geeignetes Mittel, von der großen Klasse der Streptokokken einzelne scharf getrennte Arten abzutrennen und für sie dauernde kulturelle Eigentümlichkeiten festzustellen. Je nach dem Grade der gebildeten Hämolyse und der verschiedenen Verfärbung des Blutnährbodens unterscheidet Schottmüller 3 verschiedene Arten von Streptokokken: den *Streptococcus longus pathogenes* seu *erysipelatos*, den *Streptococcus mitior* seu *viridans* und den *Streptococcus mucosus*.

Der *Streptococcus longus* seu *erysipelatos* bildet auf dem erwähnten Blutagar nach 12—18 Stunden graue, unregelmäßig rundliche Kolonien mit einem kreisrunden, hellen, hämolytischen Hof von 2—3 mm Breite. Er soll stets bei den schweren Erkrankungen, wie Erysipel, Phlegmone, Sepsis, Scharlach, Empyem und Gelenkeiterungen gefunden werden.

Im Gegensatz zu dieser *Streptococcus*-Art bildet der *Streptococcus mitior* seu *viridans* nach 24-stündigem Wachstum auf Blutagar sehr feine, grün gefärbte Kolonien. Makroskopisch ist keine Hämolyse erkennbar. Bei geringem Blutzusatz zum Nährboden soll jedoch auch der *mitior* einen schmalen hämolytischen Saum bilden, allerdings nur in einzelnen praktisch belanglosen Fällen. Schottmüller fand diesen *Streptococcus mitior* bei Erkrankungen, die einen chronischen und relativ milden Verlauf zeigen, so bei Rhinitis, Bronchitis, Pericarditis, Endocarditis, Hirnabszeß, Empyem, Enteritis.

Der *Streptococcus mucosus* unterscheidet sich endlich nach den Schottmüllerschen Angaben von den beiden erwähnten Arten dadurch, daß seine grünen Kolonien nach 24 Stunden auf Blutagar einen glänzenden, saftig schleimigen Belag bilden. Gegenüber dem *mitior*, der für Tiere sehr wenig virulent sein sollte, besitzt er eine hohe Pathogenität für Tiere.

Nach den Arbeiten Levys und Mandelbaums ist jedoch dieser *mucosus* den Pneumokokken zuzuzählen, da er sich wie der *Pneumococcus* in taurocholsaurem Natron bzw. in Galle auflöst. Des weiteren ist es, wie Mandelbaum gezeigt hat, möglich, Meerschweinchen mit dem *mucosus* gegen den *Pneumococcus* und umgekehrt erfolgreich zu immunisieren.

Da diese scharf umschriebene Klassifizierung einzelner Streptokokkenarten Schottmüllers für weitere Forschungen sehr willkommen erschien, sind seine Versuche von einer großen Anzahl Autoren nachgeprüft und zum Teil voll und ganz bestätigt, zum Teil heftig widersprochen worden. So konnten Schuhmacher, Silberstrom, Schultze, Konrad, Baumann, Fraenkel, Mandelbaum die Angaben Schottmüllers vollkommen bestätigen. Andererseits liegen jedoch Mitteilungen einer großen Anzahl von Forschern vor, denen es nach ihren Angaben gelungen ist, die einzelnen Arten ineinander überzuführen (Beitzke und Rosenthal, Levy). Namentlich wird immer wieder berichtet, daß es gelungen sei, einen *Strept. mitior* in einen *Strept. pathogenes* umzuwandeln. Der Grund zu diesen so verschiedenen Ergebnissen ist wohl am meisten in der oft festgestellten Tatsache zu suchen, daß *mitior* die Fähig-

keit, den Blutfarbstoff zu lösen, in gleichem Maße besitzen kann wie *Streptococcus pathogenes*.

Es war daher von Bedeutung, daß es durch die Arbeiten Mandelbaums möglich wurde, den *Strept. pathogenes* vom *mitior* auch dann noch scharf zu unterscheiden, wenn beide Arten auf der Blutplatte einen gleich großen hämolytischen Hof bilden. Mandelbaum wies nach, daß die Feststellung eines hämolytischen Hofes um eine Streptokokkenkolonie nicht genügt, um sie als *Pathogenes*-Kolonie zu identifizieren. Auch *mitior* ist zur Bildung eines hämolytischen Hofes befähigt. Der Hof des *mitior* sieht makroskopisch dem des *pathogenes* sehr ähnlich, tritt aber im Gegensatz zu diesem erst nach 2—3-tägigem Aufenthalt im Brutschrank auf und nur in seltenen Fällen schon nach 24 Stunden. Eine sichere Differenzierung beider Arten ist in diesem Falle nur durch die mikroskopische Betrachtung der Kolonien auf der Blutplatte möglich.

Unter dem Mikroskop ist, wie Mandelbaum angibt, die Kolonie des *Pathogenes* stets deutlich erkennbar, ohne jegliche Struktur, von grauweißer bis gelbbrauner Farbe. Die roten Blutkörperchen sind sowohl im Bereiche der Kolonie wie in der Ausdehnung des Hofes vollständig aufgelöst oder es liegen nur einzelne zusammengeballte Reste der Blutkörperchen als „Schatten“ unter der Kolonie. Auch in der Blutbouillon tritt diese Auflösung der roten Blutkörperchen ein, so daß die Bouillon burgunderrot gefärbt wird.

Ganz anders erscheint die Kolonie des *Strept. mitior* unter dem Mikroskop. Von der Kolonie selbst sieht man nichts, da sie durch dicht zusammenliegende, vollständig erhaltene Blutkörperchen verdeckt wird. Man erblickt also unter dem Mikroskop eigentlich nur die Form der Kolonie, und ihre „grobe Körnung“ ist eben nur durch die erhaltenen roten Blutkörperchen vorgetäuscht. Weiter hinaus über den Rand der Kolonie, der durch eine dunkle Linie angedeutet ist, sind auf eine kurze Strecke die Blutkörperchen ebenfalls unverändert, im Bereiche des hellen Hofes jedoch wie bei der *Pathogenes*-Kolonie vollständig aufgelöst oder nur noch als Schatten vorhanden. *Mitior* vermag also nicht die unter seiner Kolonie befindlichen oder ihr anliegenden Blutkörperchen aufzulösen, so daß seine Kolonie ein braunrotes oder zartbraunes Aussehen erhält und sich nie so scharf von dem hämolytischen Hofe abhebt wie die *Pathogenes*-Kolonie. Auch in der Blutbouillon bleiben die roten Blutkörperchen durch das Wachstum des *Strept. mitior* ganz unverändert.

Diese wichtigen, nur durch das Mikroskop feststellbaren Unterschiede ermöglichen in jedem Falle eine genaue Präzisierung der Arten. Die Angaben Mandelbaums wurden in neuester Zeit von Konrad nachgeprüft und in jeder Hinsicht bestätigt, wie sie sich auch bei den von mir untersuchten Stämmen in jedem Falle als richtig erwiesen.

Mandelbaum konnte dann ferner noch einen neuen, vollkommen avirulenten Streptokokkentypus — von ihm *Streptococcus saprophyticus* genannt — von den erwähnten und den übrigen Streptokokkenarten abtrennen. Auf den gewöhnlichen Nährböden wächst er wie die übrigen Streptokokken, dagegen bildet er auf dem Blutagar zarte grauweiße Kolonien, die bei durchfallendem Lichte leicht schwarz erscheinen. Die roten Blutkörperchen werden von dem *saprophyticus* in keiner Weise verändert. Dieser *Streptococcus* findet sich fast stets in Nase, Mund, Vagina und Darm. Zangemeister beschrieb später dieselbe Streptokokkenart mit den gleichen kulturellen Eigenschaften als *Streptococcus anhaemolyticus*.

Denselben *Streptococcus* bezeichnet Hoessli als Darm-*Streptococcus*, und in einer späteren Arbeit Schottmüller als *Streptococcus vaginalis*. Ich habe die Bezeichnung *Strept. saprophyticus*, wie ihn Mandelbaum, der ihn zuerst beschrieben und von den anderen Arten abgetrennt hat, nannte, beibehalten.

Ferner fand Mandelbaum ähnliche, nur mikroskopisch nachweisbare Unterschiede für die 3 Streptokokkenarten *pathogenes*, *mitior* und *saprophyticus* bei ihrem Wachstum in defibriniertem Menschenblute, das einer Agarplatte überschichtet wurde. Bei diesem Kulturverfahren kommt besonders gut das starke Hämolsierungsvermögen des *mitior* zum Ausdruck.

Trotz dieser prägnanten und einwandfreien Angaben kam der Streit über die Differenzierungsmöglichkeit einzelner Streptokokkenarten noch keineswegs zur Ruhe. Einerseits ließen die geringen therapeutischen Erfolge, welche die Anwendung des Antistreptokokkenserums aufwiesen, noch weitere Klärung der verwinkelten Verhältnisse wünschenswert erscheinen. Andererseits aber führte die heute vielfach erörterte Möglichkeit der „Selbstinfektion“ gesunder Wöchnerinnen zur Wiederaufnahme sogenannter Umwandlungsversuche, die man schon seit Beginn der Streptokokkenforschung angestellt hatte. Man war bemüht, einen *Strept. mitior* in einen typischen *Strept. pathogenes* umzuwandeln. Diese Umwandlungsversuche sind in großer Zahl angestellt worden. Doch auch sie haben wie alle bisher angewandten Methoden eine Einigung über die Artenheit oder Vielheit der Streptokokken nicht herbeiführen können. Der



Grund hierzu liegt darin, daß fast alle Untersucher die Umwandlung eines *Strept. pathogenes* in einen *mitior* dann für vollendet hielten, wenn beide Stämme auf der Blutplatte gleich starkes Hämolysevermögen zeigten. Daß jedoch der *Strept. mitior* die Fähigkeit, den Blutfarbstoff aufzulösen, in gleichem Maße wie der *Strept. pathogenes* besitzen kann und beide Arten in diesem Falle nur mit Hilfe des Mikroskops sicher zu unterscheiden sind, hat Mandelbaum einwandfrei nachgewiesen. Man darf daher wohl nach seinen und Konrads Arbeiten den Satz aufstellen: Alle Versuche, bei denen nicht vor und nach der Umzüchtung die benutzten Stämme mit Hilfe des „Mandelbaumschen Zeichens“ als zum Typus *pathogenes* und *mitior* zugehörig identifiziert wurden, sind für die Frage der Umwandlungsmöglichkeit dieser Streptokokkenarten bedeutungslos. Unter „Mandelbaumschen Zeichen“ versteht Konrad zusammenfassend die Angaben Mandelbaums betr. des *Strept. mitior*.

In neuester Zeit hat nun B. Zöppritz Streptokokkenversuche veröffentlicht, die eine Umzüchtung von *Strept. longus pathogenes* in *Strept. mitior* und *saprophyticus* möglich erscheinen lassen.

Zöppritz züchtete verschiedene Streptokokkenstämme vom Typus des *Strept. pathogenes* und *mitior* in Vaginalsekret, Speichel und Milch. Hierbei fand er, daß diese 3 Sekrete mehr oder weniger starke bakterizide Wirkung auf die benutzten Streptokokkenstämme, vor allem auf den *Strept. mitior*, ausüben. Besonders aber soll der Aufenthalt in diesen Sekreten Streptokokken, die vorher stark hämolyseierten, in Bouillon als flockiger Niederschlag wachsen, derart verändert haben, daß sie nach der Sekretpassage ohne Hämolyse als zarte Kolonien wuchsen und die Bouillon diffus trübten. In Speichel bildeten als *Strept. erysipelatos* bezeichnete Streptokokken nach 48-stündigem Aufenthalt im Brutofen „breite lehmfarbene Rasen ohne Hämolyse“ und 2 *Mitis*-Stämme blieben unverändert oder gingen zugrunde. Ein durch Vaginalsekretpassage in einen „typischen *Strept. erysipelatos*“ umgewandelter *Strept. mitior* verlor durch den Aufenthalt im Speichel wieder seine Fähigkeit, den Blutfarbstoff aufzulösen und bildete grüne Kolonien. Züchtung in Milch veränderte einen als *mitis* bezeichneten Streptococcus so, daß er nach 24 Stunden auf der Blutplatte „sehr starke Hämolyse“ machte. Andere Streptokokkenstämme wurden derart beeinflußt, daß zwar ihr Hämolysevermögen unverändert blieb, aber die Kolonien eine grünliche Färbung annahmen. „Es gelang also, nichthämolytischen Streptokokken hämolytische Eigenschaften anzuzüchten und einen hämolytischen in einen nichthämolytischen mit vollkommen verändertem Wachstum umzuzüchten.“

Die Wichtigkeit dieser Feststellungen, nach denen es möglich wäre, eine Art in die andere überzuführen, veranlaßte mich, diese Untersuchungen nachzuprüfen.

Die von mir benutzten Stämme wurden auf Blutplatten isoliert. Die Herstellung der Blutplatten gelang in der Weise, daß 0,5 ccm frischen defibrinierten Menschenblutes mit 5 ccm gewöhnlichem Agar bei 45° C gemischt und dann in sterile Schalen gegossen wurde. Das Blut stammte aus der Nabelschnur gesunder Wöchnerinnen und wurde in sterilen Glaskölbchen, in denen sich Glasperlen zum Defibrinieren befanden, aufgefangen. Stets wurde das Blut auf Sterilität geprüft. Wenn im Laufe der weiteren Erörterungen nichts Besonderes erwähnt wird, handelt es sich stets um Blutplatten in diesem Mischungsverhältnisse.

## I. *Streptococcus longus pathogenes* seu *erysipelatos*.

### Stamm 1—10 (Tabelle I).

Die Stämme wurden zum größten Teil von Scharlachanginen (1—8) gewonnen, Stamm 9 von einer Angina im Beginne eines Gelenkrheumatismus; Stamm 10 ist ein Laboratoriumsstamm. Auf der Blutplatte ausgestrichen bildeten alle diese Stämme nach 24-stündigem Wachstum graue oder grauweiße rundliche Kolonien, die von einem 2—3 mm breiten hämolytischen Hof umgeben sind. Die Hofbildung trat oft schon nach 8 Stunden auf und überschritt nach 24 Stunden noch die angegebene Breite. Bei Betrachtung der Kolonien mit dem Mikroskop erwiesen sich diese als strukturlose runde Gebilde. Die Blutkörperchen im Bereiche der Kolonie und des Hofes waren vollständig aufgelöst oder es

lagen nur noch Reste von Blutkörperchen, „Schatten“, unter den Kolonien. Bei Punktierung einer mit defibriniertem Blut überschichteten Agarplatte wuchsen diese Stämme als weiße Koloniehäufen mit vollständig verschwundenem Blutfarbstoff. Zwischen den einzelnen Koloniehäufen war der Blutfarbstoff unversehrt. In Bouillon wuchsen die Stämme als flockiger Niederschlag. Im hängenden Tropfen bildeten die Kokken lange Ketten.

## II. *Streptococcus mitior* seu *viridans*.

Stamm 1—16.

Die Stämme wurden von einem Gelenkrheumatismus von Empyem-eiter und Bronchialerkrankungen gewonnen. Auf der Blutplatte bildeten die Stämme dunkelgraue oder grünliche bis schwarzgrüne zarte Kolonien. Ein hämolytischer Hof war nach 24-stündigem Aufenthalt im Brutschrank nicht wahrzunehmen. Blieb die Platte jedoch 48 Stunden im Brutschrank oder mehrere Tage bei Zimmertemperatur stehen, so zeigten auch diese Kolonien einen hämolytischen Saum, der jedoch nicht die Größe des Pathogenes-Hofes erreichte. Unter dem Mikroskop sah man von der eigentlichen Kolonie nichts. Bei genauerer Betrachtung erblickte man, wie im Bereiche der Kolonie die Blutkörperchen dicht zusammengedrängt und durch einen dunkleren Saum von der Umgebung abgetrennt waren. Innerhalb der Kolonie waren die Blutkörperchen vollständig intakt. War eine Hofbildung vorhanden, so waren hier die Blutkörperchen entweder vollständig aufgelöst oder nur noch als Schatten vorhanden. In defibriniertem Blute, das auf eine Agarplatte überschichtet ist, wuchsen die Stämme als braungefärbte Koloniehäufen, die einen meist gut ausgebildeten Hof erkennen ließen. In Bouillon bildeten die Stämme teils einen flockigen, teils feinkörnigen Bodensatz, teils trübten sie die Bouillon diffus. Im hängenden Tropfen zeigten sich bald kurze, bald lange Ketten oder beide vereinigt.

## III. *Streptococcus saprophyticus*.

Stamm 17—18.

Die beiden Stämme wurden aus Speichel gewonnen. Auf der Blutplatte bildeten sie sehr zarte grauweiße Kolonien. Die Blutkörperchen blieben im Bereiche der Kolonie und ihrer Umgebung stets unverändert. Die Bouillon wurde von den beiden Stämmen diffus getrübt. Im hängenden Tropfen bildeten die Kokken vornehmlich kurze Ketten.

Die geschilderten Eigenschaften blieben bei allen Stämmen trotz monatelangem Fortzüchten auf Blutagar, Agar und Bouillon stets konstant. Es ist also wohl ersichtlich, daß es mit Hilfe der Blutplatte möglich ist, unter den Streptokokken diese 3 Typen mit scharf charakterisierten Arteigentümlichkeiten, die dauernd bestehen bleiben, bestimmt abzugrenzen. Besonders befähigt einen hierzu die mikroskopische Betrachtung der verschiedenen Kolonien auf der Blutplatte, wie sie Mandelbaum angegeben hat.

Diese Stämme, von denen jeder einzelne einwandfrei als zu einer bestimmten Klasse zugehörig identifiziert und in seinen kulturellen Eigenschaften scharf präzisiert wurde, habe ich zur Nachprüfung der Versuche Zöppritz' benutzt.

Es sei noch darauf hingewiesen, daß zu den folgenden Züchtungen in Speichel die Stämme jedesmal frisch von den Erkrankungen genommen wurden, was E. Konrad als besonders wichtig erachtet.

Tabelle I.

Stamm	Herkunft	Art	Wachstum		
			auf Blutagar	in defibriniertem überschicht. Blut	in Bouillon
1	Scharlachangina	Streptococc.	Grauweiße, rundl. Kolonien mit 2—3 mm breitem hämolytischen Hof	Weiße Kolonienhaufen mit vollständig aufgelöst. Blutfarbstoff	Flockiger Bodensatz. Lange Ketten
2	"	longus			
3	"	pathogenes			
4	"				
5	"				
6	Gelenkrheumat.		Vollständige Auflös. der roten Blutkörperchen im Bereiche d. Kolonie und des Hofes		
7	Angina				
8	"				
9	"				
10	Laborat.-Stamm				
11	Gelenkrheumat.	Streptococc.	Zarte, grüne Kolonien ohne Hämol. Nach 48 Std. schmal. Hof	Braungefärbte Kolonienhaufen mit gut ausgebildetem Hof	Flockig. od. feinkörniger Bodensatz. Diffuse Trübung Lange und kurze Ketten
12	Angina	mitior seu			
13	Empyem	viridans			
14	"				
15	Bronchitis				
16	"		Blutkörperchen im Bereiche d. Kolon. intakt, im Bereiche des Hofes aufgelöst		
17	Speichel	Streptococc.	Zarte, grauweiße Kolon. ohne Veränderung des Blutfarbstoffes		Diffuse Trübung Kurze Ketten
18	"	saprophytic.			

## Versuche mit Speichel.

Diese Versuche wurden mit 7 Streptokokkenstämmen vom Typus pathogenes (Stamm 1—7) und 4 mitis-Stämmen (11—14) und den beiden saprophyticus-Stämmen angestellt (Tabelle I).

10 ccm Speichel wurden 15 Stunden lang bei 56° gehalten, dann 24 Stunden lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Durch Abstrich auf Blutagarplatten wurde er jetzt erst auf Sterilität geprüft. Der benutzte Speichel war stets steril. Es sei bemerkt, daß es nicht gelang, durch 3-stündiges Erhitzen auf 56°, wie es Zöppritz getan hat, den Speichel steril zu erhalten. Abstriche direkt nach der 3-stündigen Erwärmung blieben meist steril, während dieser Speichel nach 24-stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur wieder reichlichen Bakteriengehalt aufwies. Der sterile Speichel wurde dann in Portionen zu 0,5 ccm in kleine sterile Röhrchen abgefüllt, und in die einzelnen Röhrchen eine Platinöse einer 24-stündigen Blutagarkultur der betreffenden Stämme aufgeschwemmt, so daß also jedes Röhrchen einen bestimmten Stamm enthält. Die so beschickten Röhrchen kamen hierauf für 24 Stunden in den Brutschrank bei 37° C. Nach diesem Aufenthalte im Brutofen entnahm ich aus jedem Röhrchen eine Platinöse und untersuchte sie im hängenden Tropfen. Zugleich wurden nach gutem Durchschütteln Abstriche aus jedem einzelnen Röhrchen auf Blutagar gemacht und aus jedem Röhrchen eine Platinöse auf neuen sterilen Speichel zu 0,5 ccm übertragen. Die letzteren Uebertragungen kamen wieder für 24 Stunden in den Brutschrank. In dieser Weise wurde 4 Tage lang mit allen Stämmen fortgesetzt verfahren, indem immer wieder nach 24-stündigem Aufenthalt der letzten Röhrchen im Brutschrank neue Abstriche auf Blutagar und Uebertragungen auf frischen Speichel gemacht wurden.



Tabelle II.

Stamm	Wachstum im Speichel zu 0,5 ccm, täglich neu überimpft			
	Nach 24 Stunden	Nach 48 Stunden	Nach 3 Tagen	Nach 4 Tagen
<b>Pathogenes</b>				
1	Reichlich. Wachstum, zahl-	Keine Aenderung,	Keine Aenderung,	Keine Aenderung,
2	reiche grauweiße Kolo-	wie nach 24 Std.	wie nach 24 Std.	wie nach 24 Std.
3	nieen mit großem hämo-			
4	lytischem Hof. Voll-			
5	ständige Auflösung der			
6	roten Blutkörperchen.			
7	Wie Ausgangskultur			
<b>Mitior</b>				
11	Reichlich. Wachstum. Zahl-	Keine Aenderung,	Keine Aenderung,	Keine Aenderung,
12	reiche grüne Kolonien.	wie nach 24 Std.	wie nach 24 Std.	wie nach 24 Std.
13	Keine Hämolyse. Blut-			
14	körperchen unter der			
	Kolonie intakt. Wie			
	Ausgangskultur			
<b>Saprophyticus</b>				
17	Reichlich. Wachstum, zahl-	Keine Aenderung,	Keine Aenderung,	Keine Aenderung,
18	reiche zarte, grauweiße	wie nach 24 Std.		
	Kolonien. Keine Ver-			
	änderung der Blutkörper-			
	chen. Wie Ausgangskult.			
Kontr.	steril	steril	steril	steril

Alle Röhrchen zeigten nach dem Verweilen im Brutschrank, welchen Stamm sie auch enthalten mochten, jedesmal einen deutlichen Bodensatz, der fast die Kuppe des Röhrchens ausfüllte. Der Bodensatz stammte nicht etwa aus dem Speichel, denn nach dem 24-stündigen Aufenthalt bei Zimmertemperatur wurde der Speichel jedesmal klar abgefüllt. In jedem Röhrchen war also starkes Wachstum erkennbar und für keinen Stamm irgendwelche Hemmung nachzuweisen. Eine bakterizide Wirkung des Speichels auf die einzelnen Stämme, vor allem auf die Mitis-Stämme, wie sie Zöppritz beobachtet hat, ist in keinem Falle erkennbar gewesen. Im hängenden Tropfen bildeten der *Streptococcus pathogenes* und *mitior* teils kurze oder lange Ketten, zum Teil aber lagen die Kokken zu kleinen oder größeren Haufen zusammengeklumpt. Diese Erscheinung, die in jedem Falle wieder beobachtet wurde, sah einer Agglutination sehr ähnlich und ist sicherlich auf die Wirkung des Speichels zurückzuführen. Die beiden Stämme von *Strept. saprophyticus* ließen dagegen im hängenden Tropfen in jedem Falle lange Kettenbildung erkennen, während sie in der Ausgangskultur und in Bouillon stets nur kurze Ketten aufwiesen. Diese lange Kettenbildung ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß der *Strept. saprophyticus*, den man ja stets in Nase, Mund und Vagina findet, an ein Wachstum in Speichel gewohnt ist und jetzt bei günstigen Temperatur- und Ernährungsverhältnissen und bei Beseitigung konkurrierender Mikroben sein Wachstum ungehemmt entfalten kann.

Für die *Pathogenes*-Stämme wiesen auch die Abstriche auf Blutagar reichliches Wachstum auf. Es wuchsen stets unzählige runde, grauweiße Kolonien mit voll ausgebildetem hämolytischen Hof. Weder makroskopisch noch mikroskopisch ließen sich in irgendeiner Weise Aenderungen im Wachstum und Differenzen mit der Ausgangskultur feststellen.

Alle Abstriche der Mitior-Stämme erzeugten jeden Tag auf der Blutplatte unzählige grünliche Kolonien. Die Untersuchung der Kolonien mit dem Mikroskop ergab stets wieder die für sie geschilderten typischen Eigentümlichkeiten. Ließ man die Platten 48 Stunden im Brutofen oder bei Zimmertemperatur stehen, so bildete sich um die einzelne Kolonie oder um den ganzen Abstrich ein schmaler hämolytischer Saum. Die Blutkörperchen waren jedoch bei mikroskopischer Betrachtung im Bereiche der Kolonien stets unversehrt und im Bereiche des Saumes nur noch als Schatten vorhanden oder völlig aufgelöst. Impfte man eine von diesen hofbildenden Kolonien auf eine frische Blutplatte ab, so bildeten sich nach 24 Stunden wieder typische, grüne Mitis-Kolonien. Das makroskopische Verhalten und vor allem die mikroskopische Betrachtung beweist also, daß hier gar keine Aenderung im kulturellen Verhalten eingetreten ist.

Die Saprophyticus-Stämme wuchsen in allen Abstrichen stets genau in derselben Weise wie die Ausgangskulturen. Es waren stets die zarten Kolonien ohne jegliche Blutveränderung. Die Tabelle erläutert die geschilderten Verhältnisse.

Diese Züchtung der 3 Streptokokkenarten in Speichel haben also in keiner Weise eine Aenderung in ihrem morphologischen und kulturellen Verhalten herbeiführen können, wie es von Zöppritz angegeben worden ist, vor allem nicht einen Streptococcus pathogenes in einen Streptococcus umwandeln können, der als „breiter, lehmfarbener Rasen ohne Hämolyse“ wächst und mit einem „Darm-Streptococcus“ — id est saprophyticus — identisch sein soll. Eine bakterizide Wirkung des Speichels auf die benutzten Streptokokken hat sich nicht nachweisen lassen. Ein als Streptococcus mitis bezeichneter Stamm verlor in den Speichelpassagen Zöppritzs das starke Hämolysevermögen, das er durch Wachstum in Vaginalsekret erlangt haben soll. Es sei hierzu bemerkt, daß das erworbene Hämolysevermögen noch kein Beweis ist für die Umwandlung in einen anderen Stamm, etwa Streptococcus pathogenes — und daß der jetzt durch den Aufenthalt in Speichel bedingte Verlust des erworbenen Hämolysevermögens keinen Rückschluß auf eine etwa eingetretene Artveränderung zuläßt. Die jedem mitis eigene Fähigkeit, Blutfarbstoff aufzulösen, ist vielleicht durch das Vaginalsekret gesteigert und durch den Aufenthalt im Speichel wieder vermindert worden, dabei ist der Stamm doch in jedem Falle ein Streptococcus mitior geblieben, was eine mikroskopische Betrachtung seiner Kolonien auf der Blutplatte klar bewiesen haben würde. Mehrmals konnte von mir beobachtet werden, daß eine Mitis-Kolonie, die nach 48-stündigem Aufenthalt im Brutschrank einen hämolytischen Hof bildete, diese Hofbildung wieder verlor, wenn ich die Kolonie auf eine frische Blutplatte ausstrich. Es wurde also so durch einfache Uebertragung auf frischen Nährboden dasselbe erreicht, was Zöppritz der Einwirkung von Speichel zuschreibt.

#### Versuche mit Milch.

In diesen Versuchen wurden 4 Stämme vom Typus Streptococcus pathogenes (Stamm 7, 8, 9, 10) und 4 Stämme vom Typus Strept. mitior seu viridans (Stamm 13, 14, 15, 16) (Tab. I) benutzt.

Die Sterilisierung der Milch gelang in folgender Weise: zu 100 ccm frisch gemolkener Milch wurden 4 ccm Perhydrol Merck zugesetzt und

das Gemisch eine Stunde lang auf 56° C gehalten. Nach dieser einstündigen Erwärmung befreite ich die Milch durch Zusatz von 1 ccm Hepin, einer von Much und Römer gefundenen Katalase, von dem Perhydrol. Die Einwirkung des Hepins muß eine Stunde lang fortgesetzt werden. Nach Beseitigung des Perhydrols soll die Milch nach Zöppritz' Angaben Rohmilcheigenschaften besitzen. Die Milch wurde stets auf Sterilität geprüft und nur sterile Milch verwendet. Zu je 2 ccm dieser in sterile Röhrchen abgefüllten Milch wurde eine Oese einer 24-stündigen Blutagarkultur zugesetzt, so daß also wieder jedes Röhrchen einen bestimmten Stamm enthält. Nach 24-stündigem Aufenthalt im Brutschrank machte ich genau wie in den Speichelversuchen Abstrich auf Blutagar und Uebertragung auf neue sterile Milch. So wurde 3 Tage lang fortgesetzt verfahren.

Tabelle III.

Stamm	Wachstum in Milch zu 2 ccm, täglich neu überimpft		
	nach 24 Stunden	nach 48 Stunden	nach 72 Stunden
Pathogenes			
7	Reichliches Wachstum, wie Ausgangskultur	Keine Aenderung, wie nach 24 Stunden	Keine Aenderung, wie nach 24 Stunden
8			
9			
10			
Mitis			
13	Spärliches Wachstum, 20 Kolonien. Keine Aenderung im kulturellen Verhalten	Wachstum erloschen	—
14	Reichliches Wachstum, zahlreiche grüne Kolonien. Keine Aenderung	Keine Aenderung, wie nach 24 Stunden	4 Kolonien. Keine Aenderung des kulturellen Verhaltens
15	Reichliches Wachstum, zahlreiche grüne Kolonien mit schmalem hämolytischen Saum. Blutkörperchen unter der Kolonie intakt	Keine Aenderung, wie nach 24 Stunden	Abnahme der Kolonienzahl. Keine Aenderung im kulturellen Verhalten
16	Reichliches Wachstum, wie Ausgangskultur	Keine Aenderung, wie nach 24 Stunden	Keine Aenderung, wie nach 24 Stunden
Kontr.	steril	steril	steril

Wie aus der Tabelle ersichtlich, hat der dreitägige Aufenthalt in Milch keinen nachweisbaren Einfluß auf die 4 Pathogenes-Stämme ausgeübt. Die Ausstriche auf Blutagar waren nach dem Aufenthalt der Platte im Brutschrank jedesmal in ihrer ganzen Länge mit grauweißen rundlichen Kolonien bedeckt. Um die Kolonien war in jedem Falle ein breiter hämolytischer Hof ausgebildet. Standen die Kolonien sehr dicht, so war der ganze Abstrich von einem breiten hellen Saum umrandet. Die Abstriche glichen vollkommen denen aus einer frischen Bouillonkultur der einzelnen Stämme vor der Einimpfung in Milch. Die Blutkörperchen im Bereiche der Kolonie und des Hofes waren vollständig aufgelöst oder nur noch als Schatten vorhanden. Eine bakterizide Kraft hat also die Milch auf diese Pathogenes-Stämme nicht ausgeübt, auch ließen die Ketten im gefärbten Präparate keine Aenderung der einzelnen Elemente erkennen. Für die 4 Mitis-Stämme hat sich dagegen ein bakterizider Einfluß der Milch nachweisen lassen. Der

Mitis-Stamm 13 zeigt schon nach 24-stündigem Aufenthalte in Milch starke Wachstumsheftung. Es gingen nur noch 20 Kolonien in der ganzen Ausdehnung des Ausstriches auf. Diese Kolonien besaßen aber in allen Stücken ihre alten kulturellen Arteigentümlichkeiten, wie sie oben beschrieben sind. Nach der zweiten Ueberimpfung in Milch war das Wachstum dieses Stammes vollkommen erloschen. Eine gleich starke Beeinträchtigung der Wachstumsenergie trat bei dem Mitis-Stamm 14 erst am dritten Tage, nachdem er also dreimal in neue Milch überimpft war, auf. Die wenigen Kolonien waren jedoch auch hier typische Mitis-Kolonien und vollständig übereinstimmend mit der Ausgangskultur. Die Kolonienzahl im Ausstrich nahm auch bei dem Mitis-Stamm 15 nach dreimaliger Uebertragung ab, so daß nur die Hälfte des Ausstriches von Kolonien besetzt war. Die Kolonien waren von einem ganz feinen hämolytischen Saum umgeben, in dessen Bereich die Blutkörperchen nur als Schatten unter dem Mikroskope sichtbar waren. Die Blutkörperchen unter der Kolonie dagegen waren vollkommen intakt und die Kolonie selbst nicht zu erkennen. Es ist also durch den Aufenthalt in Milch die geringe hämolysierende Fähigkeit dieses Stammes schon nach 24-stündigem Aufenthalte im Brutschrank zum Ausdruck gekommen, während dies bei seiner Ausgangskultur erst nach 48 Stunden auftrat. Das Mikroskop beweist jedoch einwandfrei, daß die übrigens stets noch grün schimmernden Kolonien typische Mitis-Kolonien geblieben sind, und die geringe Hämolyse keinen Anhaltspunkt dafür bieten darf, den Stamm jetzt etwa als einen *Streptococcus pathogenes* zu bezeichnen. Der Mitis-Stamm 16 blieb durch die Milchpassage in seinem Wachstum und seinen kulturellen Eigenschaften ganz unbeeinflusst. Es sei noch erwähnt, daß die Stämme 13 und 14 schon die 4 Speichelpassagen durchgemacht haben und auch zu den Serumversuchen benutzt wurden, die weiter unten beschrieben werden sollen. Es sind also diese Stämme mehrere Monate auf Agar, Blutagar, Bouillon, in Speichel und Serum fortgezüchtet worden und haben vielleicht durch dieses lange Züchten auf künstlichen Nährböden starke Einbuße in ihrer Wachstumsenergie erlitten. Es konnte sich daher die bakterizide Kraft der Milch, die für die *Pathogenes*-Stämme ganz ausblieb, bei ihnen am stärksten geltend machen. Stamm 13, der älteste, und Stamm 14 wurden daher am schnellsten und stärksten beeinflusst. Die Stämme 15 und 16 wurden für die Serumversuche frisch von den Erkrankungen gezüchtet, und bei ihnen macht sich daher auch der Einfluß der Milch teils in geringem Grade, teils wenigstens für die angegebene Zeit gar nicht bemerkbar. Es dürften daher für die Prüfung der bakteriziden Wirkung eines Stoffes auf Streptokokken die Stämme am geeignetsten sein, die frisch von den Erkrankungen gezüchtet worden sind und ihre volle Wachstumsenergie noch besitzen. Die größere Widerstandskraft der *Pathogenes*-Stämme äußeren Einflüssen gegenüber im Vergleich zu der der Mitis-Stämme trat vor allem bei den Serumversuchen hervor, und es soll daher später darauf näher eingegangen werden. Es gelang also auch durch Züchtung in Milch nicht, die benutzten Stämme in solche „mit vollkommen verändertem Wachstum“ umzuwandeln, wie es Zöppritz herbeigeführt haben will.

#### Versuch mit Serum.

In allerneuester Zeit will Hössli beim Studium der verschiedenen Wirkungsweise von Plasma und Serum auf Streptokokken „durch ver-



schiedenartig modifizierte Pferdeblutpassagen typische Mitis-Stämme sowohl in Saprophyticus-Stämme wie in Pathogenes-Stämme übergeführt haben. Er brachte Mitis-Stämme in Pferdeserum, impfte aus diesem nach reichlicher Vermehrung der Streptokokken die Stämme auf Pferdeblutplatten, züchtete sie hierauf mehrere Tage lang fort und ließ sie dann wieder in Serum wachsen. Aussaaten aus dieser letzten Serumkultur auf Blutagar überimpfte er wieder mehrere Tage auf Pferdeblutplatten und beobachtete nun, daß ein Mitis-Stamm jetzt „als feinste, glashelle, vollständig farblose Tröpfchen“ ohne grüne Farbe wuchs. Diese Eigenschaft behielt der Stamm nach 6maliger Uebertragung auf Blutplatten bei. Ein anderer Mitis-Stamm verlor unter ähnlicher Versuchsanordnung zuerst seine grüne Farbe, erlangte sie dann im Serum wieder und wuchs schließlich auf Blutplatten fortgezüchtet mit starker Hämolyse. Die neu erworbenen Charakteristika traten auch auf Menschenblutplatten auf. Die Einzelheiten der Versuchsanordnung stimmen im wesentlichen mit den meinigen überein.

Zu meinen Versuchen wurden 4 Erysipelstämme (Stamm 7—10) und 4 Mitis-Stämme (Stamm 13—16) benutzt. Stamm 15 und 16 wurden zu diesen Versuchen frisch von den Erkrankungen gezüchtet. Die Milchpassagen wurden erst nach den Serumpassagen angestellt.

### I.

Pferdeserum wurde in sterilen Kolben steril aufgefangen und nach Abstellenlassen das klare Serum in sterile Röhrchen zu je 4 ccm abgefüllt: Aus einer 24-stündigen durchgeschüttelten Bouillonkultur eines jeden Stammes wurde 1 ccm in 10 ccm sterile Bouillon übertragen und gut durchgemischt. Aus dieser letzten Bouillon entnahm ich wieder je 0,4 ccm und setzte sie einem Serumröhrchen zu. Es enthält also wieder jedes Serumröhrchen einen bestimmten Stamm in der genannten Bouillonverdünnung. Auf diesen Bouillonzusatz, der in diesem Falle allein die Züchtung in Serum ermöglichte, sei mit Rücksicht auf die Ergebnisse späterer Versuche nachdrücklich hingewiesen. Nach 24-stündigem Aufenthalt der einzelnen Röhrchen im Brutofen wurde nach gutem Durchschütteln aus jedem Röhrchen ein Abstrich auf Menschenblutplatten gemacht und von diesen Abstrichen 4 Tage lang täglich neu auf Blutplatten übertragen. Von den am 4. Tage neu überimpften Plattenkulturen schwemmte ich wieder eine Oese in 4 ccm Serum auf und stellte es für 24 Stunden in den Brutofen. Abstrichkulturen aus diesem letzten Serum wurden dann auf Blutplatten wieder mehrmals fortgezüchtet. Nach 24-stündigem Aufenthalte der ersten Serumeinsaat im Brutofen ließen die Röhrchen, die mit den Erysipelstämmen infiziert waren, reichliches Wachstum erkennen. Die Kuppe der Röhrchen war mehr oder weniger von einem flockigen Bodensatz ausgefüllt. Im hängenden Tropfen konnte man zahlreiche, lange Ketten feststellen. Auf den Blutplatten wuchsen zahllose, grauweiße, rundliche Kolonien mit starker Hämolyse. Die Blutkörperchen im Bereiche der Kolonien und des hämolytischen Hofes waren vollständig aufgelöst. Ihr Wachstum stimmte mit dem ihrer Ausgangskulturen in allen Stücken vollständig überein. Weder die mehrtägige Fortzüchtung auf Blutplatten noch die zweite Serumpassage mit folgender Uebertragung auf Blutagar konnte irgendeine Aenderung der morphologischen und kulturellen Eigenschaften dieser Stämme herbeiführen.

Die beiden Mitis-Stämme 13 und 14 wurden durch den ersten

Aufenthalt im Serum abgetötet. Weder makroskopisch noch im hängenden Tropfen war irgendein Wachstum nachweisbar. Die Abstriche auf Blutplatten blieben steril. Es hat sich also bei diesen Stämmen eine starke bakterizide Kraft des Serums bemerkbar gemacht. Da diese beiden Stämme bereits die Speichelpassagen durchgemacht haben und monatelang auf verschiedenen Nährmedien fortgezüchtet wurden, so darf man wohl annehmen, daß die Wachstumsenergie dieser Stämme schon so beeinträchtigt war, daß sie, wie es sich ja auch bei den später angestellten Milchversuchen zeigte, durch die bakterizide Kraft des Serums abgetötet werden konnten.

Die beiden Mitis-Stämme 15 und 16 dagegen wiesen nach dem ersten 24-stündigen Aufenthalt in Serum reichliches Wachstum auf. Auch hier bildete sich in der Kuppe der Röhrchen ein deutlicher Bodensatz, und im hängenden Tropfen waren zahlreiche, teils kurze, teils lange Ketten zu erkennen. Die Abstriche auf Blutagar ergaben nach 24 Stunden zahlreiche, grüne zarte Kolonien mit ganz schmalem, aber schon nach dieser Zeit deutlichem hämolytischen Saume. Dieser Saum bildete sich nach 24-stündigem Aufenthalte im Brutschrank oder bei Zimmertemperatur stärker aus, so daß vereinzelt stehende Kolonien im makroskopischen Aussehen einer Pathogenes-Kolonie sehr ähnlich erschienen. Betrachtete man aber diese Kolonien mit dem Mikroskope, so sah man in jedem Falle, wie die Blutkörperchen unter den Kolonien vollkommen intakt, die Kolonien selbst nicht zu erkennen waren. Eine Erysipelkolonie würde unter dem Mikroskope sofort als graue, homogene, scharf gegen den Hof abgesetzte Kolonie bemerkbar gewesen sein, während, wie in diesem Falle, die Mitior-Kolonie nie diese Färbung und strukturlose Form darbietet, weil sie eben durch die darunter liegenden unversehrten Blutkörperchen verdeckt war. Die Hofbildung innerhalb 24 Stunden trat vor allem bei dem Stamm 15 deutlich zutage. Wurde von diesen jetzt nach zwei Tagen makroskopisch in gleichem Maße wie Pathogenes-Stämme hämolysierenden Mitis-Stämmen eine Kolonie auf eine neue Platte übertragen, so bildeten sich wieder deutlich grüne Kolonien mit sehr zartem Saum. Die weitere Uebertragung auf Blutplatten und die zweite Serumpassage hat an diesem Verhalten nichts ändern und die hämolytische Kraft dieser Mitis-Stämme nicht weiter steigern können.

Von den Ausstrichen aus der zweiten Serumpassage wurden die Stämme noch längere Zeit auf Blutplatten und in Bouillon fortgezüchtet. Hierbei verlor sich die hämolytische Fähigkeit der Mitis-Stämme derart, daß die Kolonien auf der Blutplatte immer wieder mit grüner Farbe wuchsen und den schmalen hämolytischen Saum, den sie durch Einwirkung des Serums schon nach 24 Stunden bildeten, jetzt erst wieder wie bei der Ausgangskultur nach 48 Stunden aufwiesen. Ich will noch bemerken, daß die geschilderten Versuche aus einer großen Anzahl herausgegriffen sind, daß also die Pathogenes- wie Mitis-Stämme wiederholt durch Serum geschickt wurden, ohne daß auch nur mit Ausnahme der Steigerung der hämolytischen Fähigkeit irgendeine Veränderung im kulturellen und morphologischen Verhalten der Mitis-Stämme eingetreten wäre. Schon die mikroskopische Betrachtung der Kolonien allein beweist, daß in obigem Falle nur die jedem Mitis-Stamme eigene Hämolysierungsfähigkeit gesteigert worden ist, aber von einer Aenderung des Artcharakters oder Umwandlung in einen Pathogenes-Stamm keineswegs die Rede sein kann.

Aus obigen Versuchen geht wohl ebenfalls hervor, daß eine dem Mitior durch fortgesetztes Wachstum auf Blutplatten, in Speichel, Milch, Serum oder durch Tierpassage angezüchtete Fähigkeit, Blutfarbstoff zu lösen, keinen Anhaltspunkt dafür geben kann, diesen Mitior-Stamm als in einen typischen Erysipelstamm umgewandelt zu bezeichnen. Eine hämolytische Kraft ist mehr oder weniger jedem Mitisstamme eigen, was ja vor allem bei Wachstum in defibriniertem auf Agar überschichtetem Blut deutlich wird, und diese hämolytische Fähigkeit kommt durch die benutzte Versuchsanordnung entweder erst zum Ausdruck oder wird gesteigert. Es sind daher auch die Umwandlungsversuche von Beitzke und Rosenthal und Natvig nicht beweiskräftig, da für diese Autoren die auftretende Hofbildung des mitior gleichbedeutend mit Umwandlung in *Streptococcus erysipelatos* ist. Konrad untersuchte alle seine Stämme vor und nach den Umwandlungsversuchen mit dem Mikroskope, wie es Mandelbaum geübt wissen will, und auch er weist ausdrücklich darauf hin, wie belanglos die Hofbildung eines mitior für die Frage der Umwandlung dieser Streptokokken ist. Auch ihm ist die Umwandlung dieser beiden Arten nie gelungen. Es ist daher auch völlig abzulehnen, wenn Zangemeister in seinen neuesten Arbeiten einen *Streptococcus haemolyticus*, womit er den *Streptococcus pathogenes* meint, einem *Streptococcus anhaemolyticus vulgaris* und dem „ebenfalls nicht hämolytischen“ *Streptococcus mitior seu viridans* gegenüberstellt. Als *Streptococcus anhaemolyticus vulgaris* bezeichnet Zangemeister den zuerst von Mandelbaum beschriebenen, von ihm später ebenfalls beobachteten *Streptococcus saprophyticus*. Daß ein *Streptococcus mitior seu viridans* nicht auf gleiche Stufe mit dem *Streptococcus saprophyticus* (= *anhaemol. vulg.*) gestellt werden darf, und seine Bezeichnung als „ebenfalls nicht hämolytisch“ völlig unberechtigt ist, bedarf nach allem, was oben gesagt, keiner Erwähnung mehr. Daß Erreger puerperaler Infektionen „zum Teil sicher (hämolytische Streptokokken), zum Teil möglicherweise (*Strept. virid.*) aus den anhämolysierenden Streptokokken“ hervorgegangen sind, kann nach obigen Versuchen nicht als wahrscheinlich erachtet werden, zumal die Versuche Zöppritzs, auf die sich Zangemeister bei dieser Annahme stützt, von mir in keiner Weise bestätigt werden konnten.

Weder Wachstum in Speichel, in Milch, noch in Serum und Fortzüchten auf Blutagar hat Streptokokkenstämme vom Typus des *Streptococcus longus pathogenes* und vom Typus des *Streptococcus mitior seu viridans* so beeinflussen können, daß eine Aenderung des Artcharakters oder die Umwandlung der einen in die andere Art als gelungen erachtet werden könnte.

## II.

Wie schon oben erwähnt, haben Hössli und Zöppritz bei Gelegenheit ihrer Umwandlungsversuche auch Untersuchungen über die verschiedene Wirkungsweise von Pferdeblutplasma und Serum auf Streptokokken angestellt. Ihre Experimente sind im wesentlichen Nachprüfungen und Bestätigungen von Arbeiten, die Much in neuester Zeit veröffentlicht hatte. H. Much will nämlich beobachtet haben, daß das Blutplasma eine grundverschiedene bakterizide Wirkung gegenüber dem Blutserum auf Bakterien ausübt. Diese Beobachtungen führten den

Forscher zu der Annahme zweier Arten von Bakteriozidinen, den „humoralen“ und „leukocytären“. Das Plasma besitzt die leukocytären, während dem Serum die humoralen Bakteriozidine zukommen. Die leukocytären Bakteriozidine sind Sekretionsprodukte von Leukocyten, die humoralen identisch mit den Alexinen Buchners. Der Körper bedient sich im Kampfe gegen einen bestimmten Mikroorganismus immer nur einer von diesen beiden Schutzkräften. „So werden beispielsweise die Typhusbacillen immer nur von den humoralen, die Pneumokokken immer nur von den leukocytären Bakteriozidinen angegriffen“ (Much). Nach Angaben Muchs wirken auf Streptokokken vom Typus des Strept. erysipelatos die humoralen Baktericidine des Serums nicht ein, die Streptokokken entwickeln also in Serum ein unbeschränktes Wachstum, während dieses durch die leukocytären Schutzkräfte des Plasmas stark gehemmt oder vernichtet wird. Zöppritz und Hössli dehnten diese Versuche Muchs noch mit Hilfe von Pferdeblut auf mitis und Saprophyticus-Stämme aus. Ihre Ergebnisse stimmen im wesentlichen mit denen Muchs überein, nur wuchs der Streptococcus saprophyticus nach Angaben Hösslis, im Gegensatz zu den anderen Arten, nicht im Serum, dagegen stark im Plasma. Eine bemerkenswerte Differenz besteht ferner zwischen den Untersuchungen Hösslis und Zöppritz'. Die hemmende Wirkung des Plasmas auf das Wachstum der von Zöppritz geprüften Stämme hörte nach 20 Stunden wieder auf und die Kokken nahmen an Zahl wieder zu. Die Stämme Hösslis wurden dagegen durch den 24-stündigen Aufenthalt im Plasma vollständig abgetötet. In jedem Falle trat aber in dem Serum der drei Forscher eine unbeschränkte Vermehrung der Streptokokken ein.

Es war mir daher auffallend, daß bei meinen Voruntersuchungen zu den Umwandlungen Hösslis Streptokokkenkeime, die direkt von der Blutplatte im Serum eingesät waren, nach 24-stündigem Aufenthalt im Brutofen fast sämtlich abgetötet wurden. Ich habe als Versuchsstämme die 4 Pathogenes-Stämme 7, 8, 9, 10 und die Mitior-Stämme 13, 14, 15, 16 benutzt. 1 Oese einer 24-stündigen Blutagar-kultur jedes Stammes wurde direkt in 4 ccm steriles Pferdeserum überimpft. Diese Versuche sind mit verschiedenen Seren mehrmals wiederholt worden. Dabei stellte sich nun heraus, daß in jedem Fall die 3 Mitior-Stämme 13, 14, 15 abgetötet wurden, während von dem Mitior-Stamm 16 zweimal nur noch vereinzelte Kolonien aufgingen. Auch für die Pathogenes-Stämme war eine Wachstumshemmung unverkennbar. Sehr gut machte sich dies schon makroskopisch dadurch bemerkbar, daß in den Serumröhrchen nie ein Bodensatz gebildet war. Im hängenden Tropfen konnten immer nur vereinzelte lange Ketten nachgewiesen werden. Aussaaten auf Blutagar ließen nie auf eine Zunahme, eher auf eine Abnahme der Kokkenzahl schließen. Sehr bemerkenswert ist jedoch, daß die hemmende und abtötende Wirkung bei den einzelnen Seren stets verschieden war. So wurden durch ein Serum alle Stämme abgetötet. In anderen Seren gingen wieder nur die Mitior-Stämme vollständig zugrunde, während das Wachstum der Pathogenes-Stämme bald nur in geringem Maße, bald jedoch ebenfalls stark gehemmt wurde. Zweimal war, wie gesagt, die bakterizide Kraft des Serums so gering, daß auch der Mitior-Stamm 16 in spärlicher Weise wachsen konnte. Sonst war aber in jedem Falle die Widerstandskraft der Mitior-Stämme gegenüber jener der Patho-

genes-Stämme eine viel geringere. Man mußte also im Gegensatz zu den Ergebnissen Hösslis und Zöppritz' dem Pferdeserum unbedingt eine bakterizide Kraft auf Streptokokken zusprechen, und zwar in der Weise, daß das Serum des einen Pferdes diese Kraft in hohem Maße besitzt, während sie den Seren anderer Pferde nur in geringem Maße oder gar nicht zukommt.

Zwischen meinen Untersuchungen und denen Hösslis und Zöppritz' bestand jedoch in der Versuchsanordnung ein Unterschied. Ich impfte eine Oese der Plattenkulturen direkt in das Serum, während Zöppritz und Hössli die Keime zuerst in Bouillon aufschwemmten und von dieser Bouillonaufschwemmung 0,4 ccm den Seren zusetzten. Es war nun leicht möglich, daß dieser Bouillonzusatz die Serumwirkung so veränderte, daß sich die Kokken in diesen Seren nunmehr ungehemmt vermehren konnten, während sie in meinen reinen Seren abgetötet wurden, oder doch wenigstens nie eine Vermehrung aufwiesen.

Um dies zu entscheiden, stellte ich folgende Versuche an: Zu je 4 ccm sterilem Serum wurde 0,4 ccm sterile Bouillon zugesetzt und in dieses Gemisch wieder 1 Oese einer 24-stündigen Blutagar- oder Bouillonkultur des betreffenden Stammes eingepflegt. Dieser Bouillonzusatz hat nun überraschenderweise die bakterizide Wirkung der Seren bedeutend abgeschwächt. Nach 24-stündigem Aufenthalt im Brutschrank zeigten die Serumröhrchen aller Pathogenes-Stämme einen deutlichen Bodensatz. Im hängenden Tropfen erblickte man zahlreiche, lange Ketten. Aussaaten auf Blutagar ergaben unzählige typische Pathogenes-Kolonien. Diese starke Vermehrung der Keime trat in jedem der benützten Seren auf. Auch die beiden Mitior-Stämme 15 und 16, also die frisch gezüchteten, bildeten wie die Pathogenes-Stämme jetzt einen die Kuppe der Röhrchen ausfüllenden Bodensatz und in Aussaaten auf Blutagar zahlreiche Mitior-Kolonien. Gegenüber den schon lange Zeit fortgezüchteten Mitior-Stämmen 13 und 14 machte sich dagegen trotz des Bouillonzusatzes die bakterizide Kraft der einzelnen Seren noch geltend. Einmal wuchsen jedoch auch sie in reichlichem Maße, vielleicht enthielt dieses Serum wenig hemmende Stoffe, in anderen Seren nur spärlich oder gar nicht. Auch diese Versuche sind mehrfach angestellt worden.

Aus den Versuchsergebnissen erklären sich einwandfrei die Befunde Zöppritz' und Hösslis. Die starke Vermehrung der geprüften Streptokokkenarten im Serum, wie sie diese Forscher beobachteten, ist nur durch den Zusatz der sterilen, alkalischen Bouillon ermöglicht worden. Der Bouillonzusatz hat die bakterizide Wirkung des Pferdeserums derart abgeschwächt, daß die Stämme, wenigstens alle Pathogenes-Stämme, sich ungehemmt vermehren konnten. In reinem Serum, wie ich es benutzte, tritt diese Vermehrung jedoch nie ein, sondern die einzelnen Stämme werden je nach dem Gehalt des Serums an bakteriziden Stoffen entweder abgetötet oder doch in ihrer Wachstumsenergie mehr oder weniger stark beeinträchtigt. Die Annahme Muchs, Zöppritz' und Hösslis, daß dem Serum keine bakterizide Wirkung auf Streptokokken zukomme, sondern diese nur dem Plasma vorbehalten sei, kann also nicht als richtig anerkannt werden.

Ich will noch bemerken, daß die einzelnen Stämme trotz der mehrfachen Serumpassagen nie eine Aenderung in ihrem kulturellen Verhalten aufwiesen. Ihre Kolonien behielten auf der Blutplatte stets die geschilderten Eigentümlichkeiten der Ausgangskultur bei.

## III.

Das zu ihren Versuchen benutzte Pferdeblutplasma gewannen Hössli und Zöppritz in der Weise, daß sie 1 l Pferdeblut in 100 ccm einer 10-proz. Natriumcitratlösung auffingen und das leukocytenhaltige Plasma abheberten. Hössli benutzte leukocytenfreies Plasma, dem nach Muchs Angaben die gleiche Wirkung wie dem leukocytenhaltigen zukommt. Die eingepfachten Keime schwemmten sie vorher wieder in 0,4 ccm Bouillon auf.

Bei dieser Versuchsanordnung trat nun in keinem Plasma der genannten Forscher anfänglich eine Vermehrung der eingesäten Keime ein. In dem von Zöppritz benutzten Plasma allein wuchsen die Keime erst nach 20 Stunden wieder. Da die Resultate übereinstimmend waren, glaubten die Autoren, das Vorhandensein von bakteriziden Stoffen im Plasma annehmen und nach ihren Serumversuchen auch nur für das Plasma vorbehalten zu dürfen. Aus meinen Serumversuchen ging klar hervor, daß das Fehlen der bakteriziden Kraft der Seren dieser Untersucher nur durch den Bouillonzusatz vorgetäuscht wurde, dem reinen Serum jedoch eine bakterizide Wirkung wohl zukommt. Es lag daher der Gedanke nahe, daß die von den Forschern beobachtete besondere abtötende oder hemmende Wirkung des Plasmas nicht eine spezifische Eigenschaft desselben sei, sondern nur durch den Natriumcitratzusatz bedingt oder doch verstärkt werde. Zur Prüfung dieser Verhältnisse stellte ich mir ein 1-proz. Natriumcitratserum her. In je 4 ccm dieses Natriumcitratserums impfte ich eine Oese einer 24-stündigen Blutagarkultur direkt von der Platte ohne Bouillonzusatz. Nach 24-stündigem Aufenthalt der Röhrchen im Brutofen ließen sich makroskopisch und auch im hängenden Tropfen in keinem Falle Vermehrung feststellen. Aussaaten auf Blutagar aus diesem Natriumcitratserum ergaben wieder, je nach den benutzten Seren und den einzelnen Stämmen, verschiedene Resultate. Einmal waren alle Aussaaten aus den Röhrchen vollkommen steril, aus anderen Seren konnten nur vereinzelte Pathogenes- und Mitis-Kolonien gezüchtet werden. Die Mitis-Stämme 13 und 14 wuchsen nach diesen Serumpassagen nie mehr. Es war also niemals Wachstum eingetreten, sondern die eingesäten Keime gingen im Gegenteil alle oder mindestens größtenteils zugrunde. Die dem reinen Serum eigene bakterizide Kraft ist also durch den Natriumcitratzusatz ganz bedeutend verstärkt worden und tritt jetzt in dem gleichen Maße wie in den Plasmaversuchen Hösslis und Zöppritz' auf. Um nun weiter nachweisen zu können, daß die verstärkte hemmende Wirkung des Plasmas gegenüber dem Serum nur durch den Natriumcitratzusatz bedingt sei, setzte ich wieder zu je 4 ccm des Natriumcitratserums je 0,4 ccm steriler Bouillon zu und impfte in dieses Gemisch wieder 1 Oese einer 24-stündigen Blutagarkultur jedes Stammes. Der Bouillonzusatz mußte nach den vorigen Versuchen die bakterizide Kraft des Serums abschwächen. blieb diese abschwächende Wirkung bei dem Natriumcitratserum-Bouillongemisch aus oder trat sie nicht in gleichem Maße wie bei dem reinen Serum-Bouillongemisch ein, so war dies sicher nur dem Natriumcitrat zuzuschreiben. Der erwartete Erfolg trat auch ein. Das mit den einzelnen Stämmen beschickte Natriumcitratserum-Bouillongemisch ließ nach 24 Stunden nie einen Bodensatz erkennen, während dies bei den reinen Serumbouillongemischen jedesmal der Fall war. War also schon makroskopisch der Unterschied zwischen den

6\*

beiden Seren unverkennbar, so wurde dies durch Aussaaten auf Blutagar ganz deutlich. Die Aussaaten aus dem reinen Serumbouillongemisch ergaben stets unzählige Kolonien, während aus dem 1-proz. Natriumcitratserum-Bouillongemisch immer eine weit geringere Kolonienzahl aufging. Je nach dem Gehalt der einzelnen Seren an bakteriziden Stoffen und je nach der Widerstandskraft der einzelnen Stämme variierte natürlich die Kolonienzahl. Es ist also unverkennbar, daß in diesem Falle das Ausbleiben der vollen Bouillonwirkung nur durch das Natriumcitrat bedingt sein kann. Daß schon das Natriumcitrat allein eine Hemmung des Bakterienwachstums hervorruft, ging aus den folgenden Versuchen hervor. Frische, sterile, gut alkalisierte Bouillon wurde mit 1 Proz. Natriumcitrat versetzt und in diese Bouillon die einzelnen Stämme eingepft. Zugleich wurde dieselbe Bouillon ohne Natriumcitrat mit den Stämmen infiziert. In der reinen Bouillon wuchsen die Stämme als dicker, flockiger Bodensatz oder als dichte Trübung. In der Natriumcitratbouillon blieb dreimal jedes Wachstum aus. Beim 4. Male wuchsen nur die Pathogenes-Stämme 7 und 9 und der Mitior-Stamm 16 in ganz geringem Maße. Die Widerstandskraft und besondere Wachstumsenergie dieser Stämme war in allen Versuchen offensichtlich. Daß also die Wachstumshemmung auch bei Zusatz von Natriumcitrat zu einem für die Streptokokken absolut günstigen Nährmedium, wie es obige Bouillon darstellt, eintritt, läßt wohl den sicheren Schluß zu, daß die verstärkte Wirkung des Natriumcitratserums gegenüber dem reinen Serum auch nur durch das Natriumcitrat bedingt ist.

Ich habe also beim Vergleich der hemmenden Wirkung des reinen Pferdeblutserums und des 1-proz. Natriumcitratserums dieselben Differenzen beobachten können, wie sie Much, Hössli und Zöppritz beim Vergleich von Serum und Plasma gesehen haben. Es ist daher wohl nach meinen Versuchen anzunehmen, daß dem Serum wie dem Plasma die gleiche bakterizide Wirkung auf die geprüften Streptokokkenarten zukommt. Das Fehlen der bakteriziden Wirkung der Seren Hösslis und Zöppritz' ist zum Teil wohl dessen geringem Gehalt an Bakteriozidinen zuzuschreiben, zum Teil aber sicher durch den Bouillonzusatz vorgetäuscht worden. Das von den Forschern beobachtete besondere hemmende Vermögen des Plasmas wurde nur durch Natriumcitratzusatz hervorgerufen. Der Nachweis dieser gleichen Wirkungsweise von Serum und Plasma macht auch das Vorhandensein von besonderen nur an Serum oder Plasma gebundenen Stoffen wie „humoralen“ und „leukocytären“ Bakteriozidinen unwahrscheinlich.

Zum Schlusse sei noch bemerkt, daß der Gehalt der von Hössli und Zöppritz benutzten Pferdeblutplasmen wesentlich höher als 1 Proz. ist, denn der Flüssigkeitsgehalt von 1 l Blut ist ja nicht 1000 ccm gleichzusetzen. Mit den geprüften Stämmen infizierte 2-proz. Natriumcitratbouillon blieb aber stets steril. Die aus dem Natriumcitratserum, dem Natriumcitratserum-Bouillongemisch und der Natriumcitratbouillon gezüchteten Kolonien glichen in allen Einzelheiten den Ausgangskulturen. Anzeichen für eine Umwandlung oder Artänderung konnten nie festgestellt werden.

#### Schlußergebnis.

1) Mit Hilfe der Blutplatte lassen sich von der Klasse der Streptokokken 3 Arten scharf abtrennen: *Streptococcus longus patho-*



genes seu erysipelatos, der Streptococcus mitior seu viridans und der Streptococcus saprophyticus. Die 3 Arten behalten ihre kulturellen Eigenschaften dauernd bei.

2) Die Kolonien des Streptococcus pathogenes und mitior können auf der Blutplatte makroskopisch gleiches Aussehen haben. Eine Unterscheidung ist in diesem Falle nur mit dem Mikroskope möglich.

3) Durch Züchtung auf Agar, Blutagar, in Bouillon, Speichel, Milch und Pferdeserum ist eine Umwandlung der einen Streptokokkenart in die andere nicht möglich. Eine Umwandlung eines Streptococcus mitior in einen Streptococcus pathogenes darf noch nicht als gelungen erachtet werden, wenn infolge der Versuchsanordnung die Mitior-Kolonie auf der Blutplatte der Pathogenes-Kolonie makroskopisch gleicht. Die mikroskopische Betrachtung der Kolonie ist unbedingt erforderlich.

4) Milch und Pferdeserum wirken bakterizid auf die geprüften Stämme ein.

5) Der Gehalt verschiedener Pferdeseren an bakteriziden Stoffen ist verschieden.

6) Durch Zusatz von steriler alkalischer Bouillon wird die bakterizide Kraft des Pferdeserums abgeschwächt, durch Natriumcitratzusatz erhöht.

7) In der bakteriziden Wirkungsweise von Pferdeserum und Plasma besteht kein Unterschied.

Am Schlusse meiner Arbeit spreche ich Herrn Geheimrat Professor Dr. Ritter von Bauer für die Uebernahme des Referates meinen Dank aus. Herrn Dr. M. Mandelbaum bin ich für die Ueberlassung des Themas und für die liebenswürdige Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

#### Literatur.

- Baumann, E., Beiträge zur Unterscheidung der Streptokokken. (München. med. Wochenschr. 1906. No. 25.)
- Boxer, Ueber das Verhalten der Streptokokken und Pneumokokken auf Blutnährböden. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 40. H. 4.)
- Beitzke u. Rosenthal, Zur Unterscheidung der Streptokokken mittelst Blutnährböden. (Arbeit. a. d. path. Institut. Berlin 1906.)
- Fraenkel, E., Ueber menschenpathogene Streptokokken. (München. med. Wochenschr. 1905. No. 12, 29.)
- Freyruth, F., Die Unterscheidung der Streptokokken durch Blutnährböden. (Zeitschr. f. Geb. u. Gyn. Bd. 61. H. 3.)
- Fromme, Klinische und bakteriologische Studien zum Puerperalfieber. (Arch. f. Gyn. Bd. 85.)
- Hösli, H., Verhalten der Streptokokken gegenüber Plasma und Serum und ihre Umzüchtung. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 55. H. 2.)
- Konrad, E., Weitere Beiträge zur Vaginalstreptokokkenfrage. (Beitr. z. Geb. u. Gyn. Bd. 13. H. 3.)
- v. Lingsheim, Streptokokken. (Handb. d. pathog. Mikroorg. von Kolle-Wassermann.)

- Mandelbaum, M., a) Zur Streptokokkenfrage. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 58.)  
 —, b) Ueber die Wirkung von taurocholsaurem Natron und tierischer Galle auf den Pneumococcus, Streptococcus mucosus und die anderen Streptokokken. (München. med. Wochenschr. 1907. No. 29.)  
 Much, H., Ueber humorale und leukocytaire Bakteriozidine. (Mitteil. a. d. Hamburg. Staatskrankenanst. Bd. 8. H. 7.)  
 Marmorek, Die Arteinheit der für Menschen pathogenen Streptokokken. (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 14.)  
 Natvig, H., Bakteriologische Verhältnisse in weiblichen Genitalsekreten. (Arch. f. Gyn. Bd. 76. H. 3.)  
 Riecke, H., Beiträge zur Frage der Arteinheit der Streptokokken. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 36. H. 3.)  
 Scheib, A., Ueber intrauterine Erysipelinfektion des Neugeborenen, gleichzeitig ein Beitrag zur Pathogenität peptonisierender Streptokokken. (Zeitschr. f. Geb. u. Gyn. Bd. 58. H. 2.)  
 Schlesinger, A., Experimentelle Untersuchungen über die Hämolyse der Streptokokken. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 44. H. 3.)  
 Schottmüller, Die Artunterscheidung der für den Menschen pathogenen Streptokokken durch Blutagar. (München. med. Wochenschr. 1903. No. 20–21.)  
 Scheuer, Ein Beitrag zur Kenntnis des Streptococcus mucosus capsulatus und zum Verhalten der Streptokokken auf Blutnährböden. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 43. H. 4.)  
 Schultze, W., Zur Differentialdiagnose der menschenpathogenen Streptokokken. (München. med. Wochenschr. 1907. No. 24.)  
 Schuhmacher, G., Ueber den Streptococcus mucosus und seine Unterscheidung von anderen Streptokokkenarten. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 41. H. 7.)  
 Silberstrom, Ueber die Arteinheit der Streptokokken. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 41. H. 4.)  
 Zangemeister, W., a) Ueber die Verbreitung der Streptokokken im Hinblick auf ihre Infektiosität und ihre hämolytische Eigenschaft. (München. med. Wochenschr. 1910. No. 24.)  
 — b) Der heutige Stand der Streptokokkenfrage, insbesondere für die Geburtshilfe. (München. med. Wochenschr. 1907. No. 21.)  
 — c) Die bakteriologische Untersuchung im Dienste der Diagnostik und Prognostik der puerperalen Infektion. Berlin (Karger) 1910.  
 — u. Meissl, Untersuchungen über die Verwandtschaft saprophytischer und pathogener Puerperalstreptokokken und über die Streptokokkenimmunität. (Zeitschr. f. Geb. u. Gyn. Bd. 58. H. 3.)  
 Zöppritz, Ueber Streptokokkenversuche. (Med. Klinik. 1909. No. 30.)

*Nachdruck verboten.*

## Experimentelle bakteriologische Untersuchungen von verschiedenen Streptokokkenstämmen.

[Aus der Medizinischen Klinik zu Leipzig.]

Von Prof. Dr. **Fr. Rolly**, Leipzig.

In der Literatur herrschen zurzeit in bezug auf die Streptokokken die verschiedensten Meinungen über viele Fragen sowohl klinischer wie bakteriologischer Natur. Am häufigsten infizieren die Streptokokken Menschen und Tiere von den Schleimhäuten aus, aber auch durch die Tonsillen, Lungen, durch die Bronchial- und Rachenschleimhaut dringen sie in den Körper ein. Sehr häufig finden wir sie ferner als Erreger des Puerperalfiebers, auch durch Läsionen der Haut usw. können sie in das Innere des Körpers gelangen und entweder ein Erysipel oder eine allgemeine Sepsis erzeugen. Zum Unterschied von anderen Kokken haben sie keine besondere Neigung, sich an bestimmten Stellen im

Körperinnern zu lokalisieren. Metastasenbildung sehen wir bei ihnen viel seltener als z. B. bei den Staphylokokken.

Die Krankheitsbilder, die durch sie hervorgerufen werden, sind so verschieden in ihren Symptomen, daß sich schon klinisch die Frage aufdrängt, ob diese voneinander abweichenden Erkrankungsformen durch einen einzigen Erreger erzeugt werden, oder ob in der Gruppe der Streptokokken verschiedene Arten voneinander abzutrennen sind.

Wir haben hier in der Klinik seit einer Reihe von Jahren viele Untersuchungen in dieser Richtung angestellt, und die Resultate derselben sind zum Teil in mehreren Doktordissertationen niedergelegt. Da nun die letzteren in der Literatur im allgemeinen schwer zugänglich sind, so möchte ich über einige Ergebnisse dieser Arbeiten berichten, und außerdem unsere Erfahrungen über verschiedene aktuelle Fragen auf diesem Gebiete hier kurz mitteilen.

Es kann, wie schon erwähnt, bei der Vielgestaltigkeit der Krankheitssymptome nicht wundernehmen, wenn man schon früh versucht hat, auf verschiedene Art und Weise und auch durch biologische Methoden die große Gruppe der Streptokokken nach den klinischen Erscheinungen in mehrere Klassen einzuteilen. So glaubte man, zuerst mittels der Agglutination einen Teil der Streptokokken von den anderen abzutrennen und mittels derselben eventuell ihre Herkunft und damit die durch sie erzeugte Krankheit zu erkennen. Unsere Erfahrungen in dieser Beziehung waren jedoch vollständig negativ, insofern es uns nicht gelang, bei diesen Versuchen eine Gesetzmäßigkeit in der Agglutination bei den Streptokokken von verschiedener Genese aufzufinden. So sahen wir bei 3 Untersuchungen, daß das Blut von Patienten, welche an einer *Streptococcus viridans*-Sepsis erkrankt waren, die aus ihrem eigenen Blute gezüchteten Stämme nicht agglutinierte, andererseits agglutinierte das Serum dieser Patienten verschiedene Stämme vom *Streptococcus haemolyticus*, ohne daß aber auch hier irgendwelche Gesetzmäßigkeit zu konstatieren war. Unter 5 Stämmen vom *Streptococcus haemolyticus*, welche wir aus dem Blute von 5 Sepsiskranken gezüchtet hatten, wurden 3 durch Scharlachserum agglutiniert, die beiden anderen nicht. Von 4 Scharlachstreptokokkenstämmen wurden 2 durch Scharlachserum agglutiniert, die beiden anderen nicht. Weitere Untersuchungen will ich hier übergehen, da sie, wie schon gesagt, zu keinem eindeutigen Resultate führten.

Ferner wurde die Methode der Komplementbindung zur Differenzierung der Streptokokken verschiedener Genese herangezogen. Wir selbst haben mit dem Serum von 8 Patienten, welche an einer Allgemeininfektion mit dem *Streptococcus haemolyticus* erkrankt waren, Komplementbindungsversuche mit je 3 Scharlachstreptokokken, Erysipelkokken (aus der Nase gezüchtet) und solchen aus dem Blute der Sepsiskranken gezüchteten Streptokokken ausgeführt. Deutlich positive Reaktionen erhielten wir dabei nur bei einem kleinen Teil dieser Untersuchungen (2mal bei dem Sepsis-*Streptococcus*, 4mal bei dem Scharlach-*Streptococcus* und 3mal bei dem Erysipelcoccus). Die meisten Reaktionen waren bei allen 3 Streptokokkenarten schwach positiv, ein kleiner Teil der Komplementbindungsversuche fiel gänzlich negativ aus (5mal bei dem Sepsis-, 3mal bei dem Scharlach- und 4mal bei dem Erysipelcoccus).

Wir kamen mithin hier zu ähnlichen Resultaten wie bei unseren

diesbezüglichen Untersuchungen von Unterleibstyphus- und Tuberkulose-Patienten (1), wobei wir auch positive Resultate nur in einem Teile der Fälle erzielt hatten, und diese Resultate schwankend, schwer zu beurteilen und manchmal sogar nicht spezifisch zu sein schienen. Die Angabe von Schleissner (2), welcher bei Scharlachseris und Erysipelstreptokokken niemals Komplementbindung gesehen hatte, können wir nicht bestätigen, insofern wir bei solchen Untersuchungen in einem Drittel der Fälle (9 Untersuchungen) sogar starke Komplementbindung erzielten.

In neuerer Zeit sind nun Schleissner und Spät auf Grund ihrer bakteriziden Plattenversuche zu der Ansicht gekommen, daß den Scharlachstreptokokken eine Sonderstellung unter den Streptokokken einzuräumen ist. Es hatte nämlich Schleissner früher bereits nachgewiesen, daß die Scharlachstreptokokken für Kaninchen und Meerschweinchen nur wenig pathogen und auch durch mehrfache Tierpassagen nicht stärker virulent werden, während die septischen Streptokokken meist ziemlich virulent für diese Tiere sind, und wenn nicht, dann durch Tierpassagen eine ziemlich hohe Virulenz leicht erhalten können. Weiterhin hatte Weil gefunden, daß die avirulenten Bakterien, welche durch Tierpassage keine Steigerung ihrer Virulenz erfahren, von Leukocyten stark abgetötet werden. Es war demnach zu erwarten, daß die nach Schleissner nur wenig pathogenen Scharlachstreptokokken von den Leukocyten des Kaninchens vernichtet werden, die Menschenstreptokokken anderer Genese aber nicht.

Was die Technik dieser Versuche anbelangt, so haben wir uns im allgemeinen an die von Schleissner und Spät geübte gehalten. Dieselbe ist genauer in der unter meiner Leitung und auf meine Veranlassung entstandenen Dissertation von Koch (3), woselbst auch die ganze übrige hier nicht aufgezeichnete Literatur erwähnt ist, beschrieben. Mittels dieser bei Koch eingehend angeführten Technik wurden von uns 12 verschiedene Streptokokkenstämme geprüft (5 Scharlachstreptokokken, 3 hämolytische Streptokokken von den Tonsillen Nierenkranker, 2 solche von den Tonsillen einer Angina lacunaris, je einer von einem Erysipel- und Sepsiskranken gezüchtet). In allen Fällen fand sich eine bedeutende Vermehrung der Keime bei Zusatz von aktivem als auch von inaktivem Serum allein, und eine Verminderung der Keime durch Zusatz von Kochsalzlösung allein. Unter der Einwirkung der Leukocyten plus Kochsalzlösung auf die Streptokokken fand stets eine Wachstumshemmung derselben statt, bei Zusatz von Leukocyten plus inaktivem Serum erfolgte eine allerdings nicht bedeutende Vermehrung der Keime, aber niemals, auch nicht bei den Scharlachstreptokokken, eine Verminderung.

Wir konnten demnach mittels der bakteriziden Plattenversuche keinen Unterschied im Verhalten der Leukocyten zu den Scharlachstreptokokken und denjenigen anderer Genese in bezug auf das Wachstum resp. die Abtötung dieser Streptokokken durch Leukocyten konstatieren. Nun haben Schleissner und Spät ihre Resultate mit aus dem Blut von Scharlachkranken gezüchteten Streptokokken, wir die unserigen mit aus den Tonsillen gezüchteten erhalten, und man könnte eventuell daran denken, daß hierdurch die Differenz der Resultate erklärt werden könnte. Ich konnte aber in letzter Zeit dieselben Versuche mit 3 aus dem Leichenblut von Scharlachkranken gezüchteten Streptokokken ausführen, und ich bin dabei zu denselben Resultaten wie mit den aus den Tonsillen Scharlachkranker gezüchteten gekommen.

Auch möchte ich noch bemerken, daß bei unseren Untersuchungen Scharlachstreptokokken durch Tierpassage unter Umständen sehr virulent für Mäuse und Kaninchen werden können, daß wir also auch hier die Angaben von Schleissner und Spät, die mittels Tierpassage niemals eine Steigerung der Virulenz von Scharlachstreptokokken erzielt haben, nicht bestätigen können, und wir stehen in dieser Beziehung mit Sommerfeld auf demselben Standpunkte. Bei der größten Mehrzahl der frisch aus dem Blute von Menschen gezüchteten Streptokokken ist übrigens die Tiervirulenz Mäusen und Kaninchen gegenüber meist ziemlich gering. Der Grad der Zunahme der Tiervirulenz durch fortgesetzte Tierpassagen ist bei den Streptokokken verschiedener Genese sehr schwankend, allgemeine Gesetzmäßigkeiten lassen sich hier aber auch nicht auffinden.

Weiterhin hatten wir Untersuchungen angestellt, welche eruieren sollten, ob vielleicht durch den anaphylaktischen Versuch ein Unterschied der verschiedenen Streptokokkenstämme sich finden ließe. Zu diesen Untersuchungen haben wir Scharlachstreptokokken und außerdem solche Streptokokken verwendet, welche wir aus den Tonsillen von nierenkranken Patienten gezüchtet hatten. Es wurden sensibilisierten Kaninchen und Meerschweinchen (je 4) je 1 ccm einer 24-stündigen Bouillonkultur dieser Streptokokken intraperitoneal, und zwar jedem Tiere stets vom selben Stamm, mit welchem dasselbe vorbehandelt war, injiziert. Bei allen diesen Tieren trat jedoch kein anaphylaktischer Shock nach den Injektionen ein, auch keine Sepsis oder Nephritiserscheinungen. Der Urin dieser Tiere wurde stets als normal befunden.

Die Injektionen mit dem Streptokokkenanaphylatoxin verliefen ebenfalls bei den Tieren ohne anaphylaktischen Shock und ohne Krankheitserscheinungen. Die Technik dieser Versuche war dieselbe wie bei Friedberger (4): Es wurden ca. 10 ccm Blut aus der Carotis eines sensibilisierten Kaninchens entnommen und zentrifugiert. Eine frische Bouillonkultur desselben Streptokokkenstammes, mit welchem die Tiere vorbehandelt waren, wurde mit dem so gewonnenen Serum (Ambozeptorserum) versetzt, und dieses im Kontakt mit den Bakterien 16 Stunden lang im Eisschrank gewesene Serum wurde alsdann den Tieren in einer Dosis von 2—4 ccm intravenös injiziert. Wie schon erwähnt, blieben aber alle injizierten Tiere gesund.

Bis in die letzte Zeit spielt die auf Blutagarplatten durch einen Teil der Streptokokken hervorgerufene Hämolyse bei der Frage der Virulenz eine große Rolle. Von verschiedener Seite wird behauptet, daß die Virulenz der Streptokokken mit der Hämolyse im Zusammenhang stehe, ja sogar parallel mit ihr gehe. Wir können diese Angaben durchaus nicht bestätigen, insofern wir verschiedene Streptokokken nicht-hämolytischer Natur bei akuten Sepsiskranken (15 Fälle, davon 13mal *Strept. viridans*, 2mal *Strept. anhaemolyticus vulgaris*) aus dem Blute der Patienten züchteten. Und wir müssen doch annehmen, daß alle diese Streptokokkenstämme, da sie bei allen unseren Patienten eine tödliche Infektion hervorgerufen haben, für den Menschen auch pathogen sind. Einer dieser Stämme (*Strept. anhaemolyticus vulgaris*), den ich außerdem auf seine Tiervirulenz untersuchte, war derartig virulent, daß eine subkutane Injektion einer Oese von einer 24-stündigen Bouillonkultur desselben bei Mäusen innerhalb 24 Stunden eine tödliche Infektion hervorrief.

Alle unsere Erfahrungen sprechen unbedingt gegen eine Verallgemeinerung des Satzes, daß die Virulenz etwas mit der Hämolyse zu tun

habe. Wir sehen verhältnismäßig oft, daß sowohl Streptokokken als auch andere Bakterien eine sehr starke Hämolyse zeigen können und dabei für alle möglichen Tiere absolut nicht virulent sind.

Nun ist in neuerer Zeit viel davon die Rede gewesen, daß nicht-hämolytische Streptokokken in hämolytische, und auch umgekehrt durch verschiedene Manipulationen übergeführt werden können. Unsere Erfahrungen in dieser Beziehung sind aber, kurz gesagt, völlig negativ. Wir züchteten monatelang an- und hämolytische Streptokokken im Pferdeserum und Pferdeplasma, auf Menschen- und Tierblutplatten, im menschlichen Blutplasma und auf unseren gewöhnlichen Nährböden, deren Alkaleszenzgrad und sonstige Zusammensetzung wir auf die verschiedenste Art und Weise variierten, es gelang uns aber dabei niemals, hämolytische in anhämolysche oder anhämolysche in hämolytische Streptokokken überzuführen. Wir sind in dieser Beziehung zu demselben Resultat gekommen wie Sachs (5), welcher die Hämolyse der Streptokokken als eine konstante Eigenschaft bestimmter Streptokokkenstämme ansieht.

Die Versuchsergebnisse von Zöppritsch (6), welcher durch Einwirkung von Vaginalsekret, Milch und Speichel einen *Strept. anhaemolyticus* in einen *haemolyticus* umgewandelt haben will, können wir ebenfalls auf Grund eigener Versuche nicht bestätigen.

Ein Fall von Hüssy (7), bei welchem während eines fieberhaften Wochenbettes im Uterussekret hämolytische, im Blute aber anhämolysche Streptokokkenstämme gefunden wurden, kann nicht als ein Beweis für eine Umwandlung hämolytischer in anhämolysche Streptokokken gelten, trotzdem der Verfasser der Ansicht ist, daß in diesem vorliegenden Falle eine derartige Ueberführung stattgefunden habe.

Weiterhin ist behauptet worden, daß anhämolysche Streptokokken, wenn sie in ein Wundgebiet kommen, hämolytisch, und andererseits, wenn dieselben dann wieder aus dem Infektionsbereich heraus gelangen, wieder anhämolysch werden. Zangemeister (8) glaubt, daß die zur Hämolyse disponierten Streptokokken vor der Infektion anhämolysch waren und die hämolytische Fähigkeit erst erwerben, nachdem sie infiziert haben und in das lebende Gewebe eingedrungen sind. Diesen Schluß zog Zangemeister aus dem Grunde, weil er fand, daß außerhalb des Wundbereiches, z. B. an der Hebammenhand, sich ausschließlich nur anhämolysche Streptokokken befanden, während dieselbe erfahrungsgemäß gelegentlich Infektionen mit hämolytischen Streptokokken hervorruft. Ferner sollen nach Zangemeister frisch infizierte Wunden anhämolysche Streptokokken, dieselben Wunden später aber hämolytische Streptokokken aufweisen. Außerdem wurden im Vaginalsekret in einem weit höheren Prozentsatz hämolytische Streptokokken bei den Wöchnerinnen nachgewiesen, bei welchen früher während des Geburtsaktes anhämolysche Streptokokken gefunden worden waren.

Alle diese Argumente sind jedoch keineswegs dazu geeignet, eine Umwandlung von anhämolyschen in hämolytische Streptokokken zu beweisen, und auch der Versuch von Zangemeister, bei welchem er auf der Haut zwischen den Schulterblättern hämolytische Streptokokken aufgepinselt hat und nach 3 Tagen daselbst nur noch anhämolysche Streptokokken fand, ist nicht eindeutig. Zangemeister zog auf Grund dieses Versuches den Schluß, daß gewisse normale Körpersekrete die Fähigkeit haben, den Streptokokken die Hämolyse zu nehmen.

Man findet nun aber in Wunden bei Tieren, welche man mit Strepto-

kokken infiziert hat, sehr häufig 1—2 Tage nach der Infektion überhaupt keine Streptokokken mehr, sondern Staphylokokken oder andere Bakterien, und kein Mensch wird doch hier behaupten wollen, daß diese Bakterien aus den Streptokokken hervorgegangen wären. Geradesowenig ist aber auch der Schluß erlaubt, daß in dem oben angeführten Versuche die anhämolysischen Streptokokken aus den hämolysischen entstanden seien.

Bei Tierversuchen, welche ich zusammen mit Grütz (9) ausgeführt habe, konnten wir ferner nachweisen, daß, wenn wir die Wunden aseptisch angelegt hatten und sie mit Glaskappen vor einer nachträglichen Infektion schützten, niemals etwas Derartiges eintrat. Wir haben auf diese Weise Wunden mit *Strept. haemolyticus*, *anahaemolyticus* und *viridans* infiziert und haben bei einer späteren Abimpfung stets diejenigen Bakterien, mit welchen wir die Wunde infiziert hatten, wiedergefunden; oder aber die betreffenden infizierten Bakterien waren in einem Teil der Versuche in der Wunde zugrunde gegangen und die Wunde steril. Niemals jedoch haben wir einen Uebergang von nicht-hämolysischen in hämolysische oder umgekehrt bei diesen Tierversuchen gesehen.

Wenn wir demnach auf Wunden oder im Vaginalsekret bei Wöchnerinnen in einem größeren Prozentsatz hämolysische Streptokokken als auf der normalen Haut und in einem normalen Vaginalsekret antreffen, so können wir uns sehr wohl denken, daß infolge des besseren, dem *Strept. haemolyticus* mehr zusagenden Nährbodens oder aus sonst uns noch unbekannten Gründen die hämolysischen Streptokokken daselbst angereichert werden und alle anderen Bakterien verdrängen.

Im Darm und auf den anderen Schleimhäuten liegen z. B. ähnliche Verhältnisse vor: da sehen wir auch, daß bei katarrhalischen und anderen Entzündungen die gewöhnlich in ihm vorkommenden Bakterien fast gänzlich verschwinden können und durch andere Bakterien, welche man im normalen Zustande fast nur mittels des Anreicherungsverfahrens [siehe Rolly und Liebermeister und Rolly (10)] hier nachzuweisen vermag, ersetzt werden.

Auch in der Vagina wird die Bakterienflora durch ähnliche Momente wie im Darm offenbar beeinflußt. Ein normales Abfließen von Uterussekrete, eine normale Zusammensetzung desselben, eine normale Vaginalschleimhaut etc. werden auch hier die Infektion von pathogenen Keimen verhindern, ähnlich wie dies im Dünndarm infolge einer normalen Dünndarmschleimhaut, einer normalen Peristaltik und eines normalen Darmsekrets geschieht.

Erst wenn die Vaginal- oder Uterusschleimhaut entzündet ist und eine Stagnation der Sekrete eintritt oder die Zusammensetzung des letzteren pathologisch wird, wird die Bakterienflora krankhaft verändert und kann dann zu Infektionen führen.

Alles in allem, glaube ich, auf Grund unserer Versuche, zu dem Ausspruche berechtigt zu sein, daß ein Uebergang von hämolysischen in anhämolysische Streptokokken bis jetzt nicht bewiesen ist, und daß es ganz verkehrt ist, sich etwa vorzustellen, daß die Streptokokken deswegen infektiös sind, weil sie auf festen Blutnährböden hämolysische Eigenschaften zeigen.

Es sprechen ferner unsere klinischen Erfahrungen gegen eine derartige Annahme, da, wie oben schon ausgeführt, wir unter unseren Sepsis-kranken neben allerdings sehr zahlreichen Allgemeininfektionen mit dem hämolysischen *Streptococcus*, auch solche mit *Strept. anahaemo-*



lyticus (13 *Strept. viridans* und 2 *Strept. anhaemolyticus vulgaris*) sich befanden, und alle die zuletzt genannten 15 mit dem Tode endeten. Wenn ein Uebergang von *Strept. anhaemolyticus* in den *haemolyticus* bei einer jedesmaligen Infektion stattfinden sollte, so hätte doch der *Strept. haemolyticus* im Blute der genannten 15 Patienten und nicht der *anhaemolyticus* gefunden werden müssen.

Die in der Literatur beschriebenen Versuche, die Streptokokken in verschiedene Unterarten einzuteilen, sind unserer Meinung nach nicht erfolgreich gewesen. So ist z. B. eine Einteilung der Streptokokken in einen *Streptococcus pyogenes longissimus, conglomeratus* und *brevis* vor allen Dingen deswegen nicht durchführbar, weil die Länge der Ketten durch die Zusammensetzung des Nährbodens, Alter der Kultur etc. sehr leicht zu beeinflussen ist und aus einem einzigen *Streptococcus* alle diese Varietäten leicht zu züchten sind. So wuchsen z. B. unsere sämtlichen Streptokokkenstämme, sobald wir sie in einer Bouillon züchteten, in welcher sich kleine Kartoffelstückchen [wie zur Anaërobenkultur Rolly (11)] befanden, in sehr langen Ketten usw.

Da demgegenüber die Art des Wachstums auf den Blutagarplatten konstant zu sein scheint und sich nicht durch irgendwelche äußere Einflüsse ändert, so teilen wir hier in der Klinik nach dem Vorgange von Schottmüller schon seit langer Zeit die Streptokokken in 4 Klassen ein, und zwar in den *Strept. haemolyticus, anhaemolyticus, viridans* und *mucosus*. Wir glauben, daß auch vom klinischen Standpunkt aus eine derartige Einteilung aus verschiedenen Gründen bis zu einem gewissen Grade berechtigt ist.

Auf die klinischen Erscheinungen der einzelnen Streptokokkensepsisformen will ich hier nicht eingehen, da Steinert (12), auch Steutzel (13) und Brawermann (14) über unsere Erfahrungen in dieser Beziehung bereits berichtet haben.

#### Literatur.

- 1) Rolly, Die Wassermannsche Reaktion bei Lues und anderen Infektionskrankheiten. (Münch. med. Wochenschr. 1909. No. 2.)
- 2) Schleissner, Folia serol. Bd. 3. 1909. p. 231.
- 3) Koch, Bakteriologische Untersuchungen der Tonsillen bei Scharlach und Nephritis mit besonderer Berücksichtigung der Nephritis. [Dissert.] Leipzig 1911.
- 4) Friedberger, Ueber die Beziehungen zur Ueberempfindlichkeit und Immunität. (Berl. klin. Wochenschr. 1910. No. 32.)
- 5) Sachs, Ueber Streptokokkenhämolyse. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 63. 1909. p. 463.)
- 6) Zöppritz, Ueber Streptokokkenversuche. (Med. Klinik. 1909. No. 30.)
- 7) Hüssy, Zur Variation der Hämolyse der Streptokokken. (Gynäkol. Rundschau. Jahrg. 5. Heft 2.)
- 8) Zangemeister, Ueber die Verbreitung der Streptokokken im Hinblick auf ihre Infektiosität und ihre hämolytische Eigenschaft. (Münch. med. Wochenschr. 1910. No. 24.)
- 9) Grütz, Ueber die Verbreitung und Umwandlung von anhämolysierenden in hämolytische Streptokokken. [Dissert.] Leipzig 1911.
- 10) Rolly und Liebermeister, Ueber die Ursachen der Abtötung von Bakterien im Dünndarm etc. (Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 83. p. 414) und Rolly, Experimentelle Untersuchungen über das biologische Verhalten der Bakterien im Dickdarm. (Dtsche med. Wochenschr. 1906. No. 43.)
- 11) Rolly, Ueber die Ursache des scheinbar aeroben Wachstums von Anaëroben in flüssigen Medien etc. (Münch. med. Wochenschr. 1907. No. 31.)
- 12) Steinert, Akute und chronische Streptokokkensepsis und ihre Beziehungen zum akuten Gelenkrheumatismus. (Münch. med. Wochenschr. 1910. No. 37.)
- 13) Steutzel, Ueber Bakteriämie bei Infektionskrankheiten. [Dissert.] Leipzig 1907.
- 14) Brawermann, Uebersicht über die mit Bakteriämie einhergehenden Sepsisfälle der Leipziger medizinischen Klinik. 1908. [Dissert.] Leipzig 1909.

*Nachdruck verboten.*

## Fliegenlarven und Tollwutvirus. Lyssizide Wirkung und Virusübertragung.

Von Prof. Dr. **Claudio Fermi**,

Vorstand des hygienischen und antirabischen Institutes an der kgl. Universität Sassari.

Zur Erforschung der eventuellen Uebertragung des Tollwutvirus durch Fliegenlarven und deren Wirkung auf dieses Virus setzte ich folgende Untersuchungen an:

In einer ersten Versuchsreihe fütterte ich Fliegenmaden mit tollwütigem Gehirne, dann prüfte ich die Virulenz derselben durch Emulgierung und subkutane Injektion. In einer zweiten Versuchsreihe zerrieb ich fixes Virus und Fliegenlarven zu einer Emulsion, die ebenfalls subkutan geimpft wurde.

### A. Verhalten des Tollwutvirus in Fliegenpuppen.

**Versuchsmethode.** Eine große Menge Fliegenmaden wird auf das Gehirn eines mittelst fixen Virus getöteten Kaninchens gebracht. Haben die Maden die ganze Nervenmasse verzehrt und sich in Puppen umgewandelt, so werden sie mit steriler physiologischer Lösung sorgfältig gewaschen, zerrieben und filtriert; vom Filtrat wird  $\frac{1}{4}$  ccm weißen Mäusen subkutan eingeimpft.

Datum 1909	Zahl und Art der Versuchs- tiere	Impfungs- weg	Impfungsmaterial	Ergebnis
8. Okt.	eine Maus	subkutan	Emulsion der mit tollwütiger (f. V.) Nervensubstanz verfütterten Flie- genlarven	stirbt nach 24 Std.
"	dgl.	"	dgl.	" " 48 "
"	"	"	"	" " 3 Tagen
"	"	"	"	lebt
"	"	"	"	"
"	"	"	"	"

**Ergebnis.** Von 6 in der angegebenen Weise geimpften Mäusen starben 3, d. h. die Hälfte, nach 1–3 Tagen aus anderer Ursache.

### B. Verhalten des fixen Virus in Fliegenlarven.

**Versuchsmethode.** Eine große Menge Fliegenmaden wird auf das Gehirn eines durch fixes Virus getöteten Kaninchens gebracht; nach-

Datum 1909	Zahl und Art der Versuchs- tiere	Impfungs- weg	Impfungsmaterial	Ergebnis
8. Okt.	eine Maus	subkutan	Emulsion der mit tollwütiger Nerven- substanz gefütterten Fliegenlarven	stirbt nach 2 Tagen
"	dgl.	"	dgl.	" " 3 "
"	"	"	"	lebt
"	"	"	"	"
"	"	"	"	"
"	"	"	"	"

dem die Maden das ganze Gehirn aufgezehrt haben, werden sie mit steriler physiologischer Lösung sorgfältig gewaschen und zerrieben; vom Filtrat werden 0,25 ccm weißen Mäusen subkutan eingepfht.

**Ergebnis.** Von 6 in der angegebenen Weise geimpften Mäusen starben 2 nach 2—3 Tagen aus anderer Ursache.

Um die Mortalität herabzusetzen, werden die Emulsionen auf 1:100, resp. 1:1000, anstatt auf 1:10 verdünnt und widerstandsfähigeren Ratten injiziert.

Datum 1910	Zahl und Art der Ver- suchstiere	Impfungs- weg	Impfungsmaterial	Ergebnis
23. August	eine Ratte dgl.	subkutan	Emulsion 1-prom.	lebt
"	"	"		"
"	"	"		"
"	"	"	Emulsion 1-proz.	"
"	"	"		"
"	"	"		"
"	"	"		"

**Ergebnis.** Alle 8 mit 1-prom. und 1-proz. Emulsion der mit tollwütigem Gehirne ernährten Fliegenmaden geimpften Ratten überlebten.

Der Versuch wird in folgender Anordnung nochmals wiederholt:

8 g Gehirn eines mittelst fixen Virus getöteten Kaninchens werden mit 2 g lebenden Fliegenlarven versetzt; nachdem diese die ganze Nervenmasse gefressen haben, bereite ich wie oben 2-proz. und 1-prom. Emulsionen, womit Mäuse und Ratten geimpft werden.

Datum 1910	Zahl und Art der Ver- suchstiere	Impfungs- weg	Impfungsmaterial	Ergebnis
27. August	eine Ratte dgl.	subkutan	Emulsion 1-proz.	lebt
"	"	"		"
"	"	"		"
"	eine Maus dgl.	"		"
"	"	"		"
"	eine Ratte dgl.	"	Emulsion 1-prom.	"
"	"	"		"
"	"	"		"
"	eine Maus dgl.	"		"
"	"	"		"

**Ergebnis.** Alle Versuchstiere überlebten.

### C. Wirkung der Larvenemulsion auf das fixe Virus.

Die vorhergehenden Ergebnisse ließen schon annehmen, daß nicht nur der Verdauungstraktus und der Larvenleib, sondern auch etwaige Sekrete oder Exkremente der Fliegenlarven eine entschiedene lyssizide Wirkung entfalten dürften. Um auch über diesen Punkt klar zu werden, stellte ich folgenden Versuch an:



0,5 g fixen Virus wurden mit 1 g Fliegenlarven zerrieben, die Emulsion mit 100 ccm steriler physiologischer Lösung verdünnt, davon 0,5 ccm nach 5 Stunden Ratten subkutan eingepflegt:

Datum 1910	Zahl und Art der Versuchs- tiere	Impfungs- weg	Impfungsmaterial	Ergebnis
23. August	eine Ratte	subkutan	Emulsion von f. V. und Fliegenlarven	stirbt an Tw. d. 29. 8.
"	dgl.	"	dgl.	lebt
"	"	"	"	"
"	"	"	"	"
"	"	"	"	"
"	"	"	"	"
"	"	"	"	"
"	"	"	"	"
"	"	"	"	"
"	"	"	"	"
"	"	"	"	"

Ergebnis. Von 12 in der angegebenen Weise geimpften Ratten starb nur eine nach 6 Tagen.

Schlußfolgerung. Aus den bisher angeführten Versuchen erhellt, daß: 1) Fliegenmaden lebendes Tollwutvirus nicht übertragen können; 2) das fixe Virus seiner Virulenz auf subkutanem Wege berauben, d. h. es attenuieren.

Versuch. 0,5 ccm fixes Virus werden mit 1 g lebender, resp. 10 Minuten auf 100° C erwärmter Fliegenlarven zerrieben; die Emulsion wird mit 100 ccm steriler physiologischer Lösung versetzt und 5 Stunden stehen gelassen, dann auf 1:1000, resp. 1:5000 verdünnt und  $\frac{1}{4}$  ccm Hunden und Meerschweinchen subdural, zwei Tropfen Ratten ebenfalls subdural eingepflegt.

Datum 1910	Zahl und Art der Versuchs- tiere	Impfungs- weg	Impfungsmaterial	Ergebnis	
				Anfang der Paralyse	Todeseintritt
23. Nov.	ein Hund	subdural	Emulsion 1-prom. aus f. V. + frischen Fliegenmaden	29. Nov. 7 Uhr vorm.	30. Nov. 8 Uhr vorm.
"	dgl.	"	dgl.		lebt
"	"	"	Emulsion 1-prom. aus f. V. + erwärmten Fliegenmaden	29. Nov. 7 Uhr vorm.	30. Nov. 6 Uhr nachm.
"	"	"	dgl.		lebt
30. Nov.	ein Meerschw.	"	Emulsion 1:5000 aus f. V. + frischen Fliegenmaden	4. Dez. 3 Uhr nachm.	5. Dez. 7 Uhr vorm.
"	dgl.	"	dgl.	5. Dez. 7 Uhr nachm.	6. Dez. 7 Uhr vorm.
"	"	"	dgl.	dgl.	dgl.
"	"	"	Emulsion 1:5000 aus f. V. + erwärmten Fliegenmaden	7. Dez. 7 Uhr vorm.	7. Dez. 7 Uhr nachm.
"	"	"	dgl.	13. Dez. 7 Uhr vorm.	13. Dez. 7 Uhr nachm.
"	"	"	"		lebt
6. Dez.	eine Ratte	"	"	11. Dez. 7 Uhr vorm.	12. Dez. 7 Uhr nachm.
"	dgl.	"	"	dgl.	dgl.
"	"	"	"		lebt
"	"	"	"	12. Dez. 7 Uhr vorm.	12. Dez. 7 Uhr nachm.
"	"	"	"	dgl.	dgl.

**Ergebnis.** Wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, übt die Fliegenlarvenemulsion nur eine Attenuationswirkung auf das fixe Virus aus, d. h. es hebt sein Infektionsvermögen auf subkutanem Wege durch direkte Beeinflussung des Virus oder indirekte Beeinflussung des Organismus auf, besitzt aber kein absolut lyssizides Vermögen, da das mit Fliegenlarvenemulsion gemischte Virus subdural noch infektiösfähig ist. In der Tat starben 11 unter 15 Versuchstieren (4 Hunde, 6 Meer-schweinchen und 5 Ratten) ohne Verlängerung der Inkubationszeit.

Datum 1010	Zahl und Art der Versuchs- tiere	Impfungs- weg	Impfungsmaterial	Ergebnis	
				Anfang der Paralyse	Todeseintritt
Mehlkäferlarven.					
2. Jan.	eine Ratte	subkutan	Emulsion (1-proz.) frischer Larven + f. V. (1-proz.)	8. Jan. 7 Uhr vorm.	8. Jan. 4 Uhr nachm.
"	dgl.	"	dgl.	dgl.	dgl.
"	"	"	Emulsion (1-proz.) gekochter Larven + f. V. (1-proz.)	"	8. Jan. 7 Uhr nachm.
"	"	"	dgl.	"	dgl.
"	"	subdural	Emulsion (1-proz.) frischer Larven + f. V. (1-prom.)	"	"
"	"	"	dgl.	"	"
"	"	"	Emulsion (1-prom.) gekochter Larven + f. V. (1-prom.)	"	"
"	"	"	dgl.	"	"
"	"	"	Kontrolle (1-proz. f. V.)	"	"
Spulwürmer (aus Schwein).					
2. Jan.	eine Ratte	subkutan	Emulsion (1-proz.) frischer Würmer + f. V. (1-proz.)	7. Jan. 7 Uhr vorm.	7. Jan. 7 Uhr nachm.
"	dgl.	"	dgl.	dgl.	dgl.
"	"	"	Emulsion (1-proz.) gekochter Würmer + f. V. (1-proz.)	"	"
"	"	"	dgl.	"	"
"	"	subdural	Emulsion (1-prom.) frischer Würmer + f. V. (1-prom.)	"	"
"	"	"	dgl.	"	"
"	"	"	Emulsion (1-prom.) gekochter Würmer + f. V. (1-prom.)	"	"
"	"	"	dgl.	"	"
"	"	"	Kontrolle (1-prom. f. V.)	"	"
Regenwürmer.					
3. Dez.	eine Ratte	subkutan	Emulsion (1-proz.) frischer Würmer + f. V. (1-proz.)	9. Dez. 7 Uhr vorm.	10. Dez. 7 Uhr vorm.
"	dgl.	"	Emulsion (1-proz.) gekochter Würmer + f. V. (1-proz.)	dgl.	dgl.
"	"	subdural	Emulsion (1-prom.) frischer Würmer + f. V. (1-prom.)	"	"
"	"	"	Emulsion (1-prom.) gekochter Würmer + f. V. (1-prom.)	"	"
Blutegel.					
3. Dez.	eine Ratte	subkutan	Emulsion (1-proz.) frischer Blutegel + f. V. (1-proz.)	10. Dez. 7 Uhr vorm.	10. Dez. 7 Uhr nachm.
"	dgl.	"	Emulsion (1-proz.) gekochter Blutegel + f. V. (1-proz.)	dgl.	dgl.
"	"	subdural	Emulsion (1-prom.) frischer Blutegel + f. V. (1-prom.)	9. Dez. 7 Uhr vorm.	9. Dez. 7 Uhr nachm.
"	"	"	Emulsion (1-prom.) gekochter Blutegel + f. V. (1-prom.)	dgl.	dgl.

#### D. Wirkung einer Regenwürmer- und Blutegelemulsion auf das fixe Virus.

Da die Wirkung der Fliegenmaden auf ihren Fettgehalt bezogen werden konnte, so wurden noch weitere fettreiche Tiere, wie Mehlkäferlarven (*Tenebrio molitor*), Spulwürmer, Regenwürmer und Bluteegel, zum Vergleich herangezogen.

Versuch. 0,5 g fixes Virus wird mit 1 g lebender, resp. 10 Minuten auf 100° C erhitzter Tiere zerrieben; die Emulsion wird mit 100 ccm steriler physiologischer Lösung verdünnt und 5 Stunden stehen gelassen, dann 1/4 ccm Ratten subkutan eingepfht. Von derselben auf 1:1000 bei der Impfung verdünnten Mischung werden zwei Tropfen Ratten subdural injiziert.

Ergebnis. Alle Tiere starben unverzüglich an Tollwut. Entgegen dem Verhalten der Fliegenlarven, hatte die Emulsion aus Mehlkäferlarven, Spulwürmern, Regenwürmern und Blutegeeln das fixe Virus keineswegs attenuiert, denn es behielt sein volles Infektionsvermögen auf subkutanem Wege bei.

#### E. Wirkung der Fliegenlarvenemulsion auf das Immunisationsvermögen des fixen Virus.

Nachdem die starke Beeinflussung des fixen Virus durch Fette bewiesen worden war, trachtete ich, festzustellen, ob auch Fliegenlarven den antirabischen Impfstoff inaktivieren.

Versuchsmethode. Mit Straßenvirus im voraus geimpfte Ratten wurden während 11 Tagen mit einer Emulsion aus Fliegenlarven und fixem Virus (5-proz.) unter Phenolzusatz (1-proz.) täglich zweimal injiziert.

Datum	Zahl und Art der Versuchstiere	Impfungsweg	Immunisationsbeginn	Impfungszahl täglich	Dauer Tage	Impfungsmenge einmalig	Impfungsmaterial	Impfungsmenge total	Ergebnis	
									Anfang der Paralyse	Todes-eintritt
1919 Dez.	eine Ratte	subkutan	1. Dez.	2	11	1 ccm	Emulsion aus Fliegenlarven + f. V. (5-proz.) + Phenol (1-proz.)	22 ccm	10. Dez. 7 Uhr vorm.	11. Dez. 7 Uhr vorm.
"	dgl.	"	"	"	"	"	dgl.	"	"	"
"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
"	"	"	"	"	"	"	Kontrolle	"	"	"

Ergebnis. Fliegenlarvenemulsion inaktiviert den antirabischen Impfstoff, indem dieser wahrscheinlich von ihren Fettbestandteilen absorbiert wird.

Es bleibt noch zu erforschen, ob es sich um eine direkte Attenuationswirkung auf das fixe Virus oder eine indirekte Beeinflussung des Organismus (Verlangsamung der Absorption usw.) handelt.

*Nachdruck verboten.*

## Etude biologique et histologique de deux nouveaux Trypanosomes chez un chardonneret de nos pays.

Par le Dr. **Jean P. Cardamatis,**

Professeur agrégé des maladies des pays chauds à la Université d'Athènes.

Avec 1 planche.

### I.

J'ai examiné un grand nombre d'oiseaux de nos pays pour l'étude des Trypanosomes qu'on y rencontre. Sur 978 oiseaux de campagne qui ont été examinés, 5 étaient infectés de Trypanosomes (rapport d'infection 0,51 %) et sur 200 oiseaux domestiques aussi examinés il n'y en avait aucun de contaminé.

De ces oiseaux deux étaient des pies grièches grises<sup>1)</sup> qui ont été reconnues infectés sur 92 d'examinées (rapport d'infection 2,17 %) et trois chardonnerets et ces mangeurs de chardons une fois infectés sur 100 oiseaux examinés (rapport d'infection 3 %).

Les observations rapportées ci-dessous par nous ne touchent pas les Trypanosomes observés sur les pies grièches grises, car ils étaient très rares non seulement dans la circulation du sang périphérique mais encore dans les viscères. Par suite, ils ne pouvaient constituer un sujet d'étude particulière mais touchent les Trypanosomes des chardonnerets, lesquels étaient très abondants dans l'un d'entre eux, et même tellement abondants que sur une préparation sèche de sang périphérique, sur une étendue de  $\frac{1}{50}$  de la lame j'ai compté en tout 86 Trypanosomes. Ce qui pourtant tout particulièrement touche cette étude ce sont les Trypanosomes que j'ai observés sur un seul chardonneret, qui forment deux nouvelles espèces de Trypanosomes et que nous distinguons par les lettres A et B. Sur l'étendue citée au-dessus de la plaque 63 des Trypanosomes appartiennent à la lettre A, nouvelle espèce de Trypanosome et 23 appartiennent à la lettre B, deuxième espèce de Trypanosome. Cette deuxième espèce de Trypanosome appartient en partie au type des Trypanosomes qui ont été observés par Hanna sur une colombe des Indes. En outre du nombre des Trypanosomes dont j'ai parlé, j'ai aussi remarqué un microfilaire ainsi qu'un assez grand nombre d'Hématozoaires Danilewsky.

J'ai constaté que le plus grand nombre de Trypanosomes après les viscères et le sang périphérique se trouve dans les poumons. La plupart d'entre eux sont de forme plus jeune et d'aspect sphérique. Les Trypanosomes désignés par la lettre A sont plus considérables en nombre, car sur une surface de  $\frac{1}{50}$  de la lame comme il a été rapporté ci-dessus, j'en ai compté 58, tandis qu'il y en avait 6 de la seconde nouvelle espèce de Trypanosome indiquée par la lettre B. Il y avait en plus 5 Microfilaires.

Dans la rate et dans le foie j'ai retrouvé des formes semblables de Trypanosomes de chacune des deux espèces désignées par les lettres A et B et à peu près dans la même rapport relatif que dans les poumons, tous néanmoins étaient moindres en nombre, car c'est sur la même

1) *Lanius excubitor*.



étendue de la plaque que j'ai compté 15 à 20 Trypanosomes et un Microfilaire.

Dans le coeur et dans le jus des muscles du thorax j'ai retrouvé quelques parasites, et dans un rapport relatif plus grand dans la moelle des os tandis que je n'ai retrouvé absolument aucun Trypanosome dans l'encéphale.

Par suite de cette grande abondance des Trypanosomes surtout dans la circulation périphérique, j'ai pu étudier attentivement leur biologie et leurs caractères morphologiques et histologiques dans les préparations sèches et fraîches.

## II.

Les Trypanosomes que j'ai étudié chez le chardonneret, désignés par la lettre A, et qui ressemblent en partie toujours au type des Trypanosomes Rotatorium, pour ce qui est des caractères morphologiques généraux et dans leur jeune forme, alors qu'ils ont la grosseur d'un hématozoaire rouge humain, sont à peu près sphériques (Planche 1, Fig. 1). Ils ont le protoplasme formé d'un tissu compact qui est encore plus épais vers la périphérie, un gros noyau à peine visible commençant au centre du parasite et s'étendant vers la périphérie, d'un aspect ovale couvrant le tiers environ du parasite et dont la chromatine est très légèrement colorée.

Le centrosome ne se rencontre pas chez quelques-uns d'entre eux, chez la plupart il se trouve sur un point de la périphérie du parasite, légèrement ou fortement visible et parfois se présentant comme une tache allongée rouge noirâtre.

Une fois le Trypanosome agrandi en volume, le noyau devient plus compact, on y remarque un petit corps, le centrosome (Pl. 1, Fig. 4) d'où se détachent des flagelles qui à l'origine recouvrent une partie seulement du parasite (Pl. 1, Fig. 3). Au fur et à mesure que le parasite s'accroît, son noyau contracté se porte vers l'intérieur de la périphérie et peu après se recouvre partout d'une masse protoplasme (Pl. 1, Fig. 5). Voilà bientôt le parasite qui allonge la forme primitive sphérique tandis que la flagelle l'entoure selon un seul de ses côtés. (Pl. 1, Fig. 6, 7, 8.)

## III.

Les Trypanosomes qui appartiennent à cette nouvelle espèce de forme seconde, que j'ai étudié et que je distingue par la lettre B et qui, pour ce qui est des caractères généraux, ressemblent en partie aux Trypanosomes qui ont été observés par Hanna aux Indes sur des oiseaux pendant leur jeune forme, sont allongés (Pl. 2, fig. a, b). Ils ont un protoplasme très peu dense qui devient de plus en plus épais au fur et à mesure que le parasite se développe.

Alors que les plus jeunes de ces Trypanosomes ont le noyau tout-à-fait imperceptible, ils ont par contre le centrosome très visible (Pl. 2, fig. a, b, c) comme l'a remarqué Hanna sur un pigeon des Indes.

Dans les formes tout-à-fait jeunes la flagelle ne se termine pas par une extrémité libre mais entoure le parasite de tous les côtés comme une ligne (Pl. 2, fig. b). Dans les formes plus âgées la flagelle se termine par une extrémité libre à chacun des deux bouts aigus du parasite.

Aussitôt que le Trypanosome s'est suffisamment développé, le noyau apparaît au centre du parasite, de forme plutôt ovale plus faiblement

visible que les Trypanosomes de première espèce désignés par la lettre A et la chromatine seule du noyau est légèrement colorée.

#### IV.

Dans les préparations fraîches leurs formes les plus jeunes, celles de Trypanosomes désignés par la lettre A se meuvent lentement par des prolongements plutôt protoplasmiques (Pl. 1, fig. 2, 3). Les mouvements des parasites mûrs de ces deux espèces sont très vifs et se font de droite à gauche et en avant comme aussi en sens contraire et parfois comme avec une espèce de mouvement de contraction. Les mouvements de la flagelle libre sont stupéfiants et c'est pourquoi avec une grande facilité elles déplacent les Hématozoaires qui peuvent se rencontrer sur leur chemin au milieu desquels les Trypanosomes se glissent très vite. Parfois leur mouvement est tellement rapide que c'est avec difficulté qu'on peut bien en suivre les variations.

Dans les préparations sèches le protoplasme des Trypanosomes désignés par la lettre A se colore par la liqueur Giemsa ainsi que par mon procédé en bleu ciel, d'une coloration plus vive sont les Trypanosomes désignés par la lettre B. Le noyau ainsi que la chromatine de ce dernier se colorent en violet-rouge.

Dans les parasites complètement formés, désignés par la lettre A, le noyau est parfois sphérique de dimension petite ou grande, parfois ovale suffisamment visible. Il est situé à l'intérieur du parasite au centre de tout le corps dans la plupart des parasites, tandis que le centrosome se trouve à l'extrémité antérieure soit à la périphérie soit au milieu du protoplasme. De plus le centrosome est fortement coloré en violet, de sorte qu'il paraît noirâtre et il a le plus souvent la forme d'un quadrilatère irrégulier.

Dans les Trypanosomes indiqués par la lettre B le noyau dans les formes excessivement jeunes comme nous l'avons précédemment dit sont tout-à-fait imperceptibles.

Dans les formes plus grandes elles se distinguent légèrement vers le centre (Pl. 2, fig. d). Dans les parasites complètement développés (ceux qui sont mûrs), le noyau est grand, de forme ovale pour la plupart et légèrement visibles.

Le centrosome dans les formes les plus jeunes (Pl. 2, fig. a, b, c) se trouve exactement à la surface du parasite ou au point le plus éloigné avec les prolongements protoplasmiques tandis que dans les formes mûres, il se trouve vers l'intérieur de la périphérie (Pl. 2, fig. f, g, h).

Les Trypanosomes de forme B ont la flagelle bien plus longue.

La multiplication des Trypanosomes de toutes ces nouvelles espèces se fait par bipartition comme le montrent les figures ajoutées.

#### V.

En comparant entre elles les deux espèces de Trypanosomes désignées par les lettres A et B et que j'ai trouvé dans la circulation périphérique de ce même chardonneret, je déduis qu'elles appartiennent réellement à deux espèces différentes, ces différences se basant sur les points suivants:

Le stade initial d'évolution de chacune de ces espèces est différent.

a) Pour ce qui est de la forme qui est sphérique dans les jeunes Trypanosomes indiqués par la lettre A tandis qu'elle est allongée dans les jeunes Trypanosomes de seconde espèce indiqués par la lettre B.

b) Pour ce qui est du noyau qui est très visible dans les jeunes Trypanosomes indiqués par la lettre A tandis qu'il est tout à fait imperceptible sur ceux désignés par la lettre B.

c) Pour ce qui est du centrosome qui est tout-à-fait imperceptible dans les jeunes Trypanosomes indiqués par la lettre A tandis qu'il est bien visible chez ceux désignés par la lettre B.

d) Pour ce qui est de la flagelle qui, chez les jeunes Trypanosomes de la forme A, n'existe pas tandis qu'elle existe bien visiblement chez ceux de la forme désignée par la lettre B et même elle entoure partout le Trypanosome.

Le stade de maturité dans l'évolution de ces deux espèces de nouveaux Trypanosomes diffère aussi dans les caractères essentiels.

a) Pour ce qui est du protoplasme qui, chez les Trypanosomes mûrs désignés par la lettre A, sont plus épais et se colorent fortement, tandis qu'ils sont plus légèrement colorés chez ceux désignés par la lettre B.

b) Pour ce qui est du noyau qui, chez les Trypanosomes mûrs indiqués par la lettre A, se colorent fortement, tandis que chez ceux indiqués par la lettre B, ce sont seulement des portions de la chromatine du noyau qui se colorent très légèrement.

c) Pour ce qui est de l'extrémité postérieure qui est sphérique ou obtuse chez les parasites mûrs indiqués par la lettre A, tandis qu'elle est très aiguë et très fine chez les Trypanosomes mûrs indiqués par la lettre B.

d) Pour ce qui est de la flagelle qui est courte et couvre l'un seul des côtés des Trypanosomes mûrs indiqués par la lettre A tandis qu'elle est bien plus longue chez ceux désignés par la lettre B où elle se termine parfois librement aux deux extrémités du parasite.

## VI.

En comparant déjà les deux nouvelles espèces décrites ci-dessus à ceux découverts par Hanna sur les pigeons et sur un corbeau des Indes, nous déduisons la conclusion qu'elles diffèrent dans leurs traits essentiels.

Certes il n'est pas possible de faire la moindre comparaison, pour ce qui est des trypanosomes que nous avons décrits comme type A, et qui dans leurs caractères morphologiques généraux ressemblent à la forme des Trypanosomes Rotatorium surtout qu'ils ne ressemblent nullement soit pour les détails particuliers, soit pour l'ensemble, à ceux observés aux Indes par Hanna. De plus nous pouvons aussi dire la même chose des Trypanosomes que nous avons décrits comme forme B, parce que :

a) L'extrémité postérieure est plus mince chez ceux-ci que chez ceux observés par Hanna.

b) Le noyau est représenté chez le pigeon, sous la forme d'un mince ruban, et chez le corbeau, il est invisible, tandis que nous observons que chez nos Trypanosomes tel que chez le chardonneret, dans les formes jeunes (Trypanosomes désignés par la lettre B) le noyau est toujours invisible et que dans les grandes formes, non seulement le noyau est bien visible, mais il a encore la forme ovale.

c) Dans nos Trypanosomes la flagelle libre à l'extrémité antérieure comme à la postérieure est très longue.

d) La membrane ondulante dans nos Trypanosomes n'est pas très visible comme chez le pigeon.

e) De ce que H a n n a n'a pas observé la multiplication par bipartition chez les Trypanosomes trouvés dans les oiseaux qu'il a étudié, il a contrairement à nous observé dans les deux espèces de jeunes trypanosomes toutes les phases de la reproduction des Trypanosomes par bipartition.

#### Explication de la table.

Fig. 1 (Grossissement: 1000 diamètres).

Trypanosome nouveau de première espèce désigné par la lettre A depuis sa forme jeune jusqu'à sa complète évolution et à sa reproduction par bipartition.

Fig. 2 (Grossissement: 1000 diamètres).

Trypanosome nouveau de seconde espèce désigné par la lettre B depuis sa forme jeune jusqu'à sa complète évolution et à sa reproduction par bipartition (h, i, j stades successifs de la division du Trypanosome).

*Nachdruck verboten.*

## Untersuchungen über arzneifeste Mikroorganismen.

### I.

### Trypanosoma Lewisi.

[Aus dem Georg Speyer-Haus, Frankfurt a. M.  
(Direktor: Exzellenz Wirkl. Geh. Rat Prof. Dr. P. Ehrlich).]

Von Dr. **Richard Gonder,**

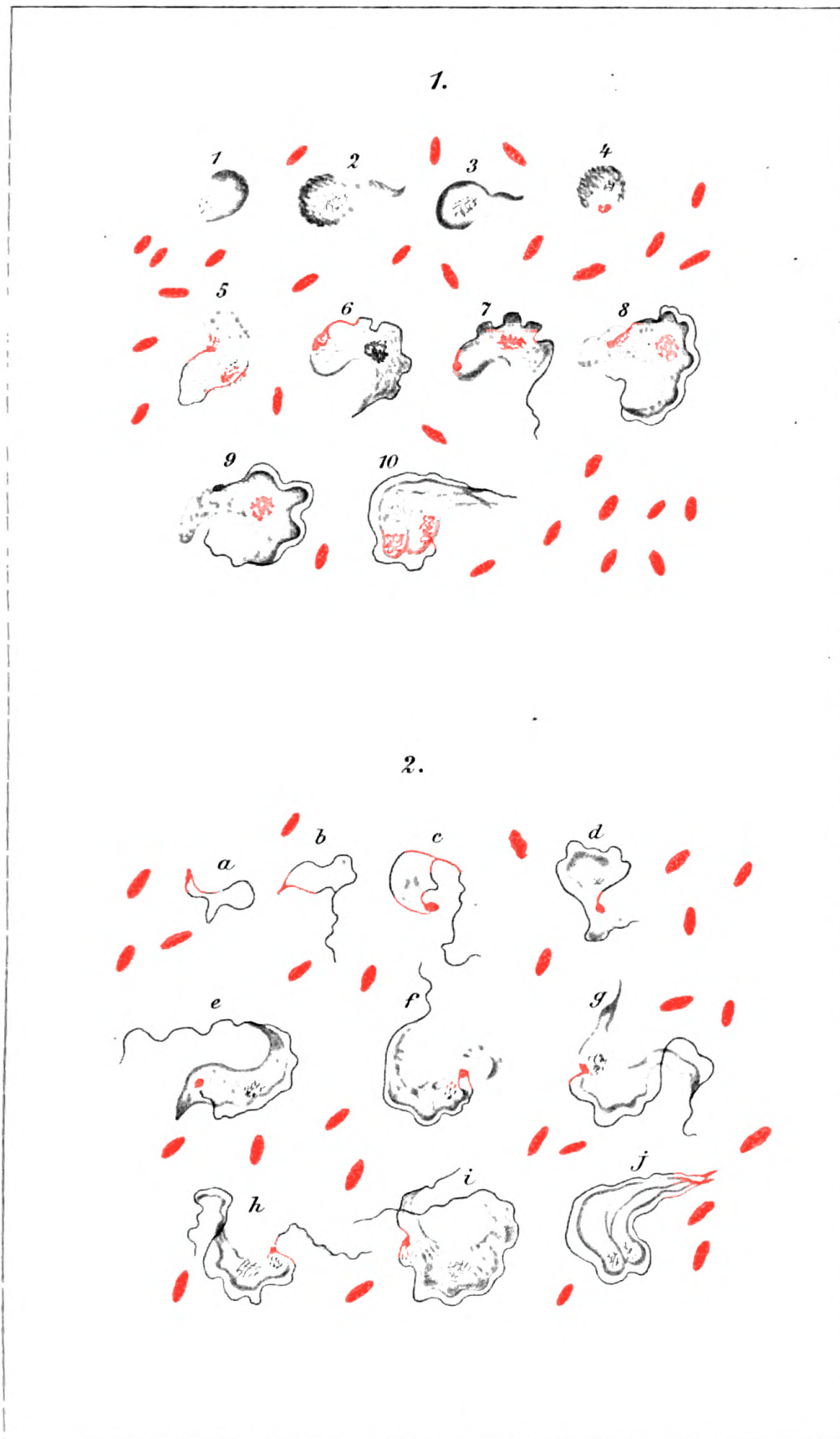
Assistenten am Georg Speyer-Haus, Frankfurt a. M.

Meine Untersuchungen über das arsenfeste *Trypanosoma Lewisi* hat bereits Exzellenz Ehrlich in einem Vortrag über Chemotherapie auf dem Mikrobiologenkongreß in Dresden (5. Mai 1911) in einer kurzen Zusammenfassung dargelegt.

Der Zweck vorliegender Arbeit ist, diese Ergebnisse ausführlicher zu erläutern und an der Hand von Experimenten und mikroskopischen Kontrollen genauer darzulegen und zu beweisen.

Bereits Ehrlich hat in einem seiner ersten Vorträge über Chemotherapie darauf hingewiesen, daß möglicherweise eine Befruchtung die Arzeneifestigkeit zu eliminieren vermag. Auch hatte schon Werbitzky, der sich hier im Georg Speyer-Haus auf Veranlassung von Exz. Ehrlich mit dieser Frage befaßte, einmal ein positives Resultat erzielt, das jedoch bis zu meinen Untersuchungen nicht mehr wieder erhalten werden konnte, da natürliche Uebertragungen nicht gelangen.

Die Untersuchungen, die ich zu Anfang dieses Jahres auf Wunsch von Exzellenz Ehrlich mit großem Interesse aufnahm, haben heute, was das *Trypanosoma Lewisi* betrifft, einen gewissen Abschluß gefunden, da in allen natürlichen Uebertragungen durch *Haematopinus* die Arzeneifestigkeit verschwand. Obwohl ja *Trypanosoma Lewisi* in mancher Hinsicht von anderen Trypanosomen abweicht, wählte ich für den ersten Teil meiner Arbeiten trotzdem dieses Trypanosom, da einmal der Entwicklungsgang desselben durch die Arbeiten von Pro-wazek, Baldrey, Rodenwaldt u. a. am besten bekannt ist, und dann auch mit dem Ueberträger dieses einheimischen Trypanosomens, der Rattenlaus, *Haematopinus spinulosus*, im Laboratorium einfacher zu arbeiten ist, als mit anderen tropischen Formen.



Verlag von Gustav Fischer in Jena.

P. Weise, Lith., Jena.



Als Material kamen erstens wilde, mit *Trypanosoma Lewisi* natürlich infizierte Ratten zur Untersuchung, deren trypanosomenhaltiges Blut auf zahme Ratten durch intraperitoneale Injektion verimpft wurde. Diese normalen Trypanosomen dienten zu Kontrollstudien für die morphologischen Untersuchungen der arsenfesten Formen. Zweitens wurde ein *Trypanosoma Lewisi*-Stamm benutzt, der im Georg Speyer-Haus in einem Zeitraum von 2 Jahren zu einer Arsenfestigkeit von 0,2 pro Kilogramm gebracht werden konnte. Am Anfang meiner Arbeiten war dieser Stamm nur fest gegen eine Dosis von 0,185 pro Kilogramm. Die Festigkeit bezieht sich auf das bekannte, für Trypanosomen äußerst giftige Arsenophenylglyzin, welches bei gleichzeitiger Injektion mit trypanosomenhaltigem Blut das *Trypanosoma Lewisi* bei einer Dosierung von 0,1 pro Kilogramm glatt tötet. Nach meinen Versuchen vermochte 0,1 pro Kilogramm, auch stärkere Infektionen von „+“ und „++“ (s. Anmerkung) wilde wie zahme Ratten von ihrer *Lewisi*-Infektion glatt zu befreien. Die Arsenophenylglyzinfestigkeit wurde durch allmähliche Gewöhnung erzielt, indem man mit äußerst geringen, weit unter der heilenden Dosis liegenden Quantitäten injizierte, und dann nach und nach mit dem Weiterimpfen dieses Trypanosomenstammes die Dosen langsam steigerte. Auf diese Weise wurde eine Festigkeit von 0,185 pro Kilogramm, jetzt von 0,2 pro Kilogramm, erzielt, die sich auch in weiteren Passagen ohne Arsenophenylglyzinbehandlung hielt, wie dies ja für andere Trypanosomen schon lange durch die Arbeiten Ehrlichs und seiner Mitarbeiter bekannt ist. Um jeden Versuchsfehler auszuschalten, wurde *Trypanosoma Lewisi* ebenfalls auf die Vererbung der Arsen-

Tabelle I.

Ratte 1 am 6. Tag +++ Trypanosomen, arsenophenylglyzinfest 0,185 pro Kilogramm

"	2a	2b	
	+ w.	+ s. w.	
	+	+	Arsenophenylglyzin 0,185 pro Kilogramm subkutan
	++	++	
	+++	+++	Versuchsreihe „b“ stets auf Festigkeit mit Arsenophenylglyzin 0,185 pro Kilogramm geprüft
	etc.	etc.	
"	3a	3b	Arsenophenylglyzin 0,185 pro Kilogramm subkutan
	+	+	
	++	++	Versuchsreihe „a“ nur zur Weiterimpfung benutzt
	++	+++	
	+++	+++	etc. 4.—19. Passage
	etc.	etc.	
"	20a	20b	s. w. Gleichzeitig mit Blut 0,185 pro Kilogramm Arsenophenylglyzin subkutan
	+ w.	+	
	+	+	
	++	++	
	++	++	
	+++	++	
	etc.	etc.	

Anmerkung: + s. w.: Im frischen mikroskopischen Präparat eines Blutstropfens ganz vereinzelt Trypanosomen.

+ w.: Im frischen mikroskopischen Präparat wenig Trypanosomen, in jedem 10. bis 12. Gesichtsfeld Trypanosomen.

+: Trypanosomen in jedem 4.—5. Gesichtsfeld.

++: Trypanosomen in jedem Gesichtsfeld.

+++ : Viele Trypanosomen in jedem Gesichtsfeld.



festigkeit geprüft, welche, wie schon gesagt und, wie aus folgender kleinen Tabelle (I) hervorgeht, erhalten bleibt.

Die Arsenfestigkeit hätte sich absolut nicht geändert, selbst wenn noch viele Passagen der Reihe „a“ ohne Behandlung weitergeimpft worden wären. Sie vererbt sich also als eine biologische Eigenheit, hier durch allmähliche Gewöhnung erworben, durch viele Passagen und tausende von Generationen hindurch. Man kann die Festigkeit nicht physikalisch auffassen, als ob der Trypanosomenkörper das Arsenpräparat bis zu einem gewissen Grad in sich aufgespeichert hätte, sondern man muß, da sich die Lewisi-Trypanosomen sowohl durch einfache Zweiteilung, als auch durch Vielteilung fortpflanzen, eine Umstimmung in den Keimesanlagen annehmen, die für die Entwicklungsformen im Rattenblut dauernd erhalten bleibt. Es ist auch nicht gut möglich, die Arsenfestigkeit schlechtweg als eine pathologische Veränderung aufzufassen, denn wie aus späterem hervorgehen wird, büßen die Trypanosomen in ihrer Lebensweise, in ihrem Bau, ihrer Pathogenität etc. absolut nichts ein.

Kudicke konnte für den sogenannten Werbitzki-Stamm, einen durch Pyronin blepharoplastlos gemachten Naganastamm den Nachweis erbringen, daß sich dieser Stamm in seinem immunisatorischen Verhalten absolut nicht verändert, sondern dem Ausgangsstamm vollkommen gleicht. Aus diesem Grunde kommt er zu dem Schluß, keine neue Art in den blepharoplastlosen Trypanosomen erblicken zu dürfen, wenngleich diese Trypanosomen durch das Fehlen des Blepharoplasten ganz erheblich von dem Grundtypus der Trypanosomen abweicht. — Da wir aber gerade morphologische Verschiedenheiten in erster Linie als das beste Kriterium für eine Artbestimmung ausnutzen und sogar ausschließlich zu nehmen gewohnt sind, würde Kudickes Beweisführung noch nicht genügend rechtskräftig sein. In zweiter Linie berücksichtigen wir allerdings auch biologische Eigenheiten, wie das immunisatorische Verhalten, z. B. der verschiedenen Rückfallfieberspirochäten, um verschiedene Arten zu unterscheiden, aber meist nur dann, wenn uns die Morphologie im Stiche läßt.

Meines Erachtens bleibt als Hauptkriterium für die Artbestimmung immer noch die Morphologie der Organismen, denn allein unter den vielen Stämmen einer und derselben Trypanosomenart finden wir oft weitgehende biologische Verschiedenheiten, besonders auch hinsichtlich der Immunität, und wir wären gezwungen, eine ganz neue Systematik zu gründen, die sich ins Unendliche verlieren würde. Anders ist es immerhin mit Veränderungen im Bau, die dann gleichzeitig eine biologische Sonderheit mit sich bringen, wie es Kudicke mit einem Naganastamm gelang, den er durch einmalige Behandlung mit einer orthochinoiden Substanz arsenfest machen konnte. Also hier haben wir einen Zusammenhang von morphologischer Veränderung mit Arsenfestigkeit.

Diese wichtigen Fragen, besonders was eben die Artbestimmung, die Veränderungen und vor allem die Vererbung dieser Eigenschaften angeht, drängen dazu, den Entwicklungsgang zu verfolgen, um vielleicht auf diesem Weg zu einer genügenden Schlußfolgerung zu kommen.

„Erstens konnte man nicht wissen, ob die Entwicklung, die im Rattenblut für gewisse Formen immer sich gleich bleibt, auch im natürlichen Ueberträger ihren normalen Fortgang nimmt.“

„Zweitens mußte man feststellen können, ob bei einer Weiterentwicklung im Ueberträger die Arsenfestigkeit bestehen bleibt oder nicht.“

„Und drittens mußte man nachweisen können, ob bei einer natürlichen Uebertragung der arsenfesten Trypanosomen die Entwicklungsformen sich auch morphologisch von den normalen unterscheiden.“

Wäre eine Uebertragung durch die Rattenlaus überhaupt nicht möglich gewesen, um auf die erste Frage zu antworten, so hätte man ruhigen Gewissens von pathologischen Veränderungen sprechen können, welche, durch die Arsenfestigkeit hervorgerufen, den Organismus, wenn auch nicht äußerlich in der Morphologie nachweisbar, so verändert hätten, daß eine Weiterentwicklung im natürlichen Ueberträger nicht möglich wurde. Denn die Trypanosomen verändern sich im *Haematopinus*-Körper so erheblich, daß eine Störung im Kernapparat oder im Protoplasma einen solchen Gedankengang rechtfertigt.

Nach vielen vergeblichen Versuchen, die sowohl mit normalen, als auch mit arsenfesten Trypanosomen und einer bestimmten Anzahl, meist 80–100 Rattenläusen, angestellt wurden, gelang es endlich, eine natürliche Uebertragung mit größeren Mengen von Läusen zu bewerkstelligen. Unter nicht weniger als 50 Experimenten mit arsenfesten Trypanosomen wurde 6mal eine Uebertragung einwandfrei erzielt, in 8 Fällen, ebenfalls unter 50, auch bei normalen Trypanosomen, die als Kontrollexperimente dienten.

Es war mir möglich, durch Zusammensperren stark verlauster Ratten die Läusezucht ziemlich gut zu entwickeln, so daß ich häufig Ratten zur Hand hatte, die viele Hunderte von Läusen in ihrem Fell beherbergten. Derart stark verlauste Ratten wurden künstlich mit trypanosomenhaltigem Blut infiziert, und auf der Höhe der Infektion, ungefähr am 5. Tage, getötet. Eine gesunde normale Ratte, die keine Läuse aufzuweisen hatte, wurde auf ein Sektionsbrett gebracht, und die getötete verlauste Ratte herangehalten, so daß in kurzer Zeit viele Hunderte von Läusen überwandern konnten. Noch rascher gingen die Läuse über, wenn man vorher das Haar der gesunden Ratte mit Salzwasser bestrich und wieder trocknen ließ. Die Inkubation, gerechnet vom Tag des Ueberwanderns der Läuse bis zum Auftreten der ersten Trypanosomen im Blut, betrug 25–30 Tage, bei den normalen Trypanosomen in 3 Fällen 15 und 17 Tage. Alle Versuchstiere wurden streng isoliert in Glasgefäßen gehalten.

Eine Uebertragung von normalen und arsenfesten Lewisi-Trypanosomen durch *Haematopinus spinulosus* war hiermit einwandfrei bewiesen.

Aus diesen Versuchen geht deutlich hervor, daß eine Entwicklung in der Rattenlaus hat stattfinden müssen, und daß die Arsenfestigkeit keinen hemmenden Einfluß auf die Geschlechtsformen und deren geschlechtliche Entwicklung auszuüben vermag.

Die auf natürlichem Wege infizierten Ratten wurden dann auf ihre Arsenfestigkeit geprüft, und zwar, wie aus folgender Tabelle II (Ratte a bis f) zu ersehen ist, in der Weise, daß mit einer unter der Festigkeitsdosis liegenden Dosis, in einzelnen Fällen mit der heilenden Dosis für normale Trypanosomen von 0,1–0,12 pro Kilogramm bei „+“ oder „+w.“-Infektion, geprüft wurde.

Auf diese Weise wurden alle 6 Ratten, die durch *Haematopinus spinulosus* infiziert wurden, auf ihre Arsenophenylglyzinfestigkeit geprüft. Um Kontrollen zu haben, wurde von der infizierten Ratte (a resp. b etc.) auf zwei neue Ratten abgeimpft, von denen eine (a2, b2) bei „+w.“-Infektion mit einer Dosis von 0,15 pro Kilogramm (0,1 pro Kilogramm) behandelt und geheilt wurde. Die andere (a1, b1), welche

Tabelle II. (Natürliche Uebertragung.)

Ratten a, b, c, d, e, f infiziert durch *Haematopinus spinulosus*, die arsenfeste Trypanosomen aufgenommen hatten.

Ratte a nach 25 Tagen

```

      +
      +
    ++
    +++ 28. Tage abgeimpft auf 2 neue Ratten, a1 und a2 Blut 10mal
          verdünnt je 2 ccm intraperitoneal
    /
  a1 + w. + w. 0,15 pro Kilogramm Arsenophenylglyzin subkutan
    +   -
    +   -
  +++   -
  /
a1 0,15 pro Kilogramm Arsenophenylglyzin subkutan 4. Tag
5. Tag -
6. " -
7. " -
etc.

```

In der gleichen Weise wurden Ratten c, d und e geprüft

Ratte f 26. Tag

```

      +
      +
    ++
    +++ 0,15 pro Kilogramm Arsenophenylglyzin subkutan
    -
    -
    -

```

Ratte b + w. nach 27 Tagen

```

      +
      +
    ++
    +++ abgeimpft auf b1 und b2
    /
  b1 + b2
    + + „0,1“ pro Kilogramm Arsenophenylglyzin subkutan
    + -
  +++ -
  +++ -
    /
0,12 pro Kilogramm Arsenophenylglyzin
-
-
-
etc.

```

Ratten b1 + „0,1“ pro Kilogramm Arsenophenylglyzin subkutan

```

      +
      +
    ++
    +++
    /
0,12 pro Kilogramm Arsenophenylglyzin
-
-
-
etc.

```

zu Anfang als Kontrolle diente, wurde bei einer starken Infektion ebenfalls auf die Arsenfestigkeit geprüft. In allen 5 Fällen war die Arsenfestigkeit verschwunden. Die 6. Ratte (f) wurde am 3. Tage (++)-Infektion) ohne Kontrolle behandelt mit einer Dosis von 0,15 pro Kilogramm, worauf am nächsten Tage und an den darauffolgenden Tagen keine Trypanosomen mehr nachzuweisen waren.

Die Ratten hatten also durch den Entwicklungsgang in *Haematopinus* ihre Arsenfestigkeit verloren.

Es handelt sich noch darum, weiter festzustellen, ob eine Uebertragung auch nicht rein mechanisch vor sich gehen kann. Die Inkubation wäre dann nicht so lang, und die Arsenfestigkeit müßte erhalten bleiben. Daß in der Tat auch rein mechanisch *Haematopinus* die Trypanosomen übertragen können, sah ich in zwei weiteren Experimenten, bei welchen sehr junge, kleine Ratten mit vielen Hunderten von Läusen beschickt wurden. Das Blut dieser kleinen Ratten zeigte bereits am 5. Tage Trypanosomen in geringer Anzahl.

Ich konnte diese Beobachtung allerdings nur zweimal machen, glaube aber, jeden Versuchsfehler ausschließen zu können, da die Ratten streng

isoliert wurden und unter täglicher Kontrolle standen. Ferner spricht aber für mechanische Uebertragung die Prüfung auf die Arsenfestigkeit (Tabelle III). Aus späteren Experimenten wird diese Tatsache noch deutlicher ihre Erklärung finden. Trotz vieler (ca. 60) weiteren Experimenten ist mir eine solche mechanische Uebertragung nicht mehr gelungen.

Tabelle III. (Mechanische Uebertragung.)

Ratte m	infiziert durch <i>Haematopinus spinulosus</i> ; am 5. Tage die ersten Trypanosomen im Blut	
	+ w.	
	+	
	++	
	++	
	+++	
Kontrolle, Ratten	m1	m2
	+	+
	++	+
	+++	++
	+++	+++
"	m3	m4
	+	+
	++	++
	+++	+++
	w. 0,15 pro Kilogramm Arsenophenyl- glyzin	
	0,185 pro Kilogramm Arsenophenyl- glyzin	

Die zweite Ratte wurde ebenso geprüft und mit dem gleichen Resultat behandelt. Die Trypanosomen blieben fest gegen die Festigkeitsdosis 0,185 pro Kilogramm.

Diese Prüfung auf die Arsenfestigkeit erlaubte also einen sicheren Schluß auf die mechanische Uebertragung.

Durch die ersten Versuche (Tabelle I und II) waren die beiden ersten Fragen über Entwicklung und Arsenfestigkeit beantwortet, und sogleich auch konnte eine Folgerung auf die Artbestimmung geschlossen werden. Wie Kudicke aus dem immunisatorischen Verhalten des sogenannten Werbitzki-Stammes den Schluß auf eine und dieselbe Art zog, so konnten wir nun den Schluß ziehen, hier in der Arsenfestigkeit eine biologische Eigenschaft vor uns zu haben, die aber nur auf bestimmte Entwicklungsformen im Rattenblut beschränkt bleiben mußte, und durch den Entwicklungsgang in der Rattenlaus verschwinden konnte. Wir erhielten wieder die alten normalen Trypanosomen, welche gleiche biologische Charaktere mit den normalen Trypanosomen teilten. Die Art blieb erhalten.

Um auf die dritte Frage eine genügende Antwort geben zu können, wurde vor allem der Entwicklungsgang sowohl der normalen, als auch der arsenfesten Trypanosomen in der Rattenlaus geprüft. Es sei hierbei erwähnt, daß bei den vielen Hunderten von Läusen, die von normalen, trypanosomenfreien Ratten abgelesen wurden und zur Untersuchung kamen, keine einzige mit *Leptomonas*- oder *Herpetomonas*-Formen infiziert waren, so daß wohl Pattons und Stricklands Auffassung, die Prowazekschen Entwicklungsformen von *Trypanosoma Lewisi* in *Haematopinus* seien harmlose Darmparasiten, hinfällig wird. Zudem sind ihre Arbeiten durch die Untersuchungen von Baldrey und Rodenwaldt zur Genüge widerlegt.

In den infizierten Läusen, sei es nun, daß sie mit arsenfesten oder normalen Trypanosomen infiziert waren, wurden stets die gleichen Formen gefunden. Es war kein Unterschied in der Morphologie zwischen arsen-

festen und normalen festzustellen. Daher war es auch natürlich, daß eine Befruchtung und die Bildung von Chritidienformen in den Läusen, welche mit arsenfesten Trypanosomen infiziert waren, stattfinden konnten.

Es ist nicht nötig, hier auf den Bau dieser Entwicklungsformen näher einzugehen, da ich die Beschreibungen von Prowazek, Baldrey und Rodenwaldt fast vollkommen bestätigen kann. Wenn es mir auch nicht gelang, die Befruchtung im Leben verfolgen zu können, so konnte ich dennoch mehrmals ookinetenähnliche Formen (am 8. Tage) sehen, welche auf eine Befruchtung hinweisen. Auch fanden sich in den Dauerpräparaten bestimmte Verschmelzungen zweier Individuen vor, die mit den Abbildungen Prowazeks über Kopulation ziemlich übereinstimmten. Ueber die Dauer der Entwicklung ist noch so viel zu sagen, daß in den ersten 3—5 Tagen sehr häufig normale, unveränderte Trypanosomen neben vielen zugrunde gehenden gefunden werden. Späterhin, bis zum 10.—12. Tage, gehen in den Trypanosomen starke Kernveränderungen und -umbildungen vor sich, die zu chritidienähnlichen Formen führen. Mitunter werden auch geißellose, ein- und zweikernige Individuen gefunden. Nach dem 12. Tage traten kleinere, häufig kugelig abgerundete Stadien auf neben einer großen Menge von kleinen, schmalen *Leptomonas*-Formen, welche durch Zweiteilung mit den Tagen immer mehr an Zahl zunahmen.

Um den Beweis zu führen, daß das Verschwinden der Arsenfestigkeit an eine Befruchtung der weiblichen Formen durch die männlichen geknüpft ist, wurden zwei große Versuchsreihen geprüft, deren eine die Infektion, resp. die verschiedenen Entwicklungsstadien in den Läusen betraf, und deren andere sich auf die Arsenfestigkeit von künstlich auf Nährböden kultivierten Trypanosomen bezog.

Stark verlauste Ratten wurden künstlich durch intraperitoneale Injektion von trypanosomenhaltigem Blut infiziert. Vom 1. bis zum 5. Tage wurden ca. 60—100 Läuse in Zwischenräumen von 24 Stunden abgelesen und in einer Uherschale unter Zusatz von 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung zerrieben. Diese Emulsion, welche auf die Entwicklungsformen der Trypanosomen untersucht wurde, injizierte ich gesunden Ratten intravenös 1 ccm und intraperitoneal 1 ccm. — Auf der Höhe der Infektion (am 5. Tage durchschnittlich) wurde die künstlich infizierte, stark verlauste Ratte getötet. Die Läuse ließ ich auf eine gesunde Ratte, wie oben beschrieben, überlaufen. Vom 6. bis zum 22. oder 25. Tage, solange eben der Läusevorrat reichte, wurde dann mit den übergelaufenen Läusen ebenso verfahren, wie vorher. Ca. 60—100 Läuse wurden abgelesen, alle 24 Stunden zerrieben und gesunden Ratten intravenös und intraperitoneal injiziert. Mit ganz wenigen Ausnahmen, welche sich fast nur auf Läuse bezogen, die nach dem 18.—20. Tage abgenommen wurden, gelang fast immer die Infektion, mit einer allerdings verschiedenen Inkubationszeit. Letztere hängt einmal von der Stärke der Infektion der Läuse ab und dann auch von den Entwicklungsstadien der Trypanosomen. Wenn man die Zeit rechnet vom 1. Tage der Infektion der mit trypanosomenhaltigem Blut künstlich infizierten, stark verlausten Ratte bis zum Erscheinen der ersten Trypanosomen im Blute der mit den Läuseemulsionen injizierten Ratte (in Tabelle IV: L 5, 9 etc.), so treten fast alle Zahlen zwischen 3—30 auf, so daß also die Inkubationszeit, die andere Autoren und ich für eine mechanische Uebertragung durch den Zwischenwirt (in meinen Experimenten „5“ Tage) und für die natürliche Uebertragung im Anschluß an einen Geschlechts-

akt (in meinen Experimenten 15, 17 und 25–30 Tage) fanden, auch durch diese Experimente ihre Bestätigung finden.

Die in oben beschriebener Weise bewerkstelligten, künstlichen Infektionen mit dem natürlichen Ueberträger wurden in allen Fällen auf ihre Arsenfestigkeit geprüft. Vom 1. bis zum 5. Tage beherbergten die Läuse noch unveränderte Trypanosomen, wie man sie im Rattenblute stets findet. Es war dies ja auch natürlich, da die Läuse in dieser Zeit noch auf einer mit Trypanosomen infizierten Ratte saßen. — Die Arsenfestigkeit blieb daher auch erhalten. Sie hielt sich aber noch weiter vollkommen bis zum 9. Tage, in zwei weiteren Versuchsreihen bis zum 11. bzw. 12. Tage. Nach dem 12. Tage dagegen war sie vollständig verschwunden.

Alle Infektionen, die mit Emulsionen solcher Läuse hervorgerufen wurden, welche nach dem 12. Tage abgelesen und injiziert wurden, waren nicht mehr arsefest, sondern normal.

In der folgenden Tabelle IV mögen zur näheren Erläuterung einige Fälle aus den Versuchsreihen, die alle mit gleichem Endergebnis verliefen, wiedergegeben werden. Die Ratten sind mit „L 5“, „L 9“ etc. bezeichnet. Die Zahlen beziehen sich auf die Tage, an welchen die Läuse abgelesen, zerrieben und injiziert wurden.

Tabelle IV.

Ratte L 5. Infiziert mit Läuseemulsion vom 5. Tage,  
+ s. w. am 6. Tage nach der Injektion,

+  
++  
+++ abgeimpft auf drei neue Ratten, L 5a, b, c.

L 5a Kontrolle	L 5b	L 5c
+	+ 0,12 pro Kilogramm	+ 0,15 pro Kilogramm
++	+ Arsenophenylglyzin	++ Arsenophenylglyzin
++	++	++
+++	++	+++

Ratte L 9 infiziert mit Läuseemulsion vom 9. Tage  
+ w. am 8. Tage nach der Injektion.

+  
++  
+++ abgeimpft auf drei neue Ratten L 9a, b, c.

L 9a Kontrolle	L 9b	L 9c
+	+ 0,12 pro Kilogramm	+ 0,185 pro Kilogramm
+	+ Arsenophenylglyzin	+ Arsenophenylglyzin
++	++	++
++	++	+

Ratte L 11 infiziert mit Läuseemulsion vom 11. Tage.  
+ w. am 9. Tage nach der Injektion.

+  
++  
+++ abgeimpft auf drei neue Ratten L 11a, b, c.

L 11a Kontrolle	L 11b	L 11c
+	+ 0,12 pro Kilogramm	+ 0,185 pro Kilogramm
++	+ Arsenophenylglyzin	— Arsenophenylglyzin
++	+	—
+++	+	—

Ratte L 13 infiziert mit Läuseemulsion vom 13. Tage.  
+ w. am 8. Tage der Injektion.

+  
+  
+ abgeimpft auf drei neue Ratten L 13a, b, c.

L 13a Kontrolle	L 13b	L 13c
+ s. w.	+ s. w. 0,1 pro Kilogramm	+ w. 0,12 pro Kilogramm
+ ++ +++	- Arsenophenylglyzin	- Arsenophenylglyzin
	-	-

Ratte L 16 infiziert mit Läuseemulsion vom 16. Tage.  
+ s. w. am 7. Tage nach der Injektion.

+ w.  
+ w.  
++ abgeimpft auf drei neue Ratten L 16a, b, c.

L 16a Kontrolle	L 16b	L 16c
+ ++ ++ +++	+ 0,12 pro Kilogramm	+ 0,12 pro Kilogramm
	- Arsenophenylglyzin	- Arsenophenylglyzin
	-	-

Ratte L 21 infiziert mit Läuseemulsion vom 21. Tage.  
+ w. am 10. Tage nach der Injektion.

+  
+  
+ abgeimpft auf drei neue Ratten L 21a, b, c.

L 21a Kontrolle	L 21b	L 21c
+ s. w.	+ s. w.	+ s. w.
+ s. w.	+ w.	+ s. w.
+ w.	+ 0,12 pro Kilogramm	+ w.
+ w.	- Arsenophenylglyzin	+ ++ 0,18 pro Kilogramm
+ ++ ++ +++	-	- Arsenophenylglyzin
	-	-

Aus dieser Tabelle geht das Vorhergesagte unzweideutig hervor. Die auf rein natürlichem Wege erzeugten Infektionen der Tabelle II finden also durch diese Versuche ihre volle Bestätigung. Das fremde Medium, der Lauskörper, nahm die Arsenfestigkeit nicht weg. Auch vermochten nicht die morphologischen Veränderungen vor dem 10. Tage die Festigkeit zu stören, sondern die Befruchtung, die durch Pro w a z e k nachgewiesen und durch das Auffinden von Ookinetenstadien bekräftigt wurde, führte erst den Normalzustand wieder herbei, so daß die „Art“ in allen ihren Charakteren erhalten blieb. Ehrlich drückte sich sehr treffend aus, indem er die Befruchtung als den „Jungbrunn“ für die Arterhaltung bezeichnete.

Eine Reihe von Experimenten mit einer aus Eiern von infizierten Rattenläusen hervorgegangenen jungen Generation wurde auf die Vererbung der Trypanosomen geprüft, sowohl durch Uebersetzen der jungen Läuse, als auch durch intravenöse und intraperitoneale Injektionen von zerriebenem Material. In allen Fällen wurde keine Infektion erzielt, so daß ich eine Vererbung durch das Ei auszuschließen glaube.

Zum Schluß wende ich mich zur anderen oben erwähnten Versuchsreihe mit auf Nährböden gezüchteten Lewisi-Trypanosomen. Der



Zweck dieser Versuche war, festzustellen, ob auch diese die Arsenfestigkeit verlieren oder bewahren, und ob sie ihre Infektiosität aufrecht erhalten.

Als Nährboden diente mir der bekannte Novysche, den ich für meine Zwecke etwas modifizierte, ferner auch gewöhnlicher Agar mit Bouillonzusatz. Die arsefesten Trypanosomen ließen sich ebensogut kultivieren, wie die normalen. Die Zurückimpfung auf Ratten gelang fast in allen Fällen prompt, einerlei, ob sie nach der ersten, zweiten, dritten etc. Passage, oder ob sie in den ersten Tagen oder nach einem Zeitraum von 3 Monaten ausgeführt wurde. Da bekanntlich die Parthenogenese bei anderen Blutparasiten, wie z. B. bei den Malaria-Parasiten für die Entstehung der Rezidive von größter Bedeutung ist, war es von besonderem Interesse, zu untersuchen, ob die von Prowazek studierte Parthenogenese der Kulturformen vielleicht ebenso, wie die Befruchtung zweier geschlechtlich differenzierter Formen die Arsenfestigkeit beseitigt oder nicht.

Morphologisch unterschieden sich die Kulturformen der arsefesten Trypanosomen nicht von den normalen. In den ersten Tagen traten viele deformierte, kugel- und keulenförmige, wohlbegeißelte Formen auf, die häufig auch kleinere Agglomerationshaufen bildeten. Bemerkenswert ist noch, daß in manchen Kulturen sehr lange auch nach drei Passagen fast unveränderte Trypanosomen nachzuweisen waren, eine Beobachtung, die eine exakte Beweisführung in den Experimenten sehr erschwerte. war. Denn wenn sich z. B. am 50. Tage noch unveränderte Trypanosomen in der Kultur vorfanden, neben vielen anderen kleinen Chritidienformen, so war ein Schluß auf die Arsenfestigkeit dieser Kulturformen nicht möglich, da die verschiedenen Stadien nicht zu isolieren waren.

Eine Befruchtung, eine Verschmelzung zweier verschieden differenzierter Individuen konnte ich niemals beobachten, dagegen immer starke Kernveränderungen, die schließlich die Bildung kleiner Chritidienformen zur Folge hatten. In älteren Kulturen, die ich jetzt schon über 3 Monate halte, treten heute nur noch Chritidienformen auf. In manchen Röhrchen zeigen sie eine starke Neigung zur Bildung von Agglomerationshaufen.

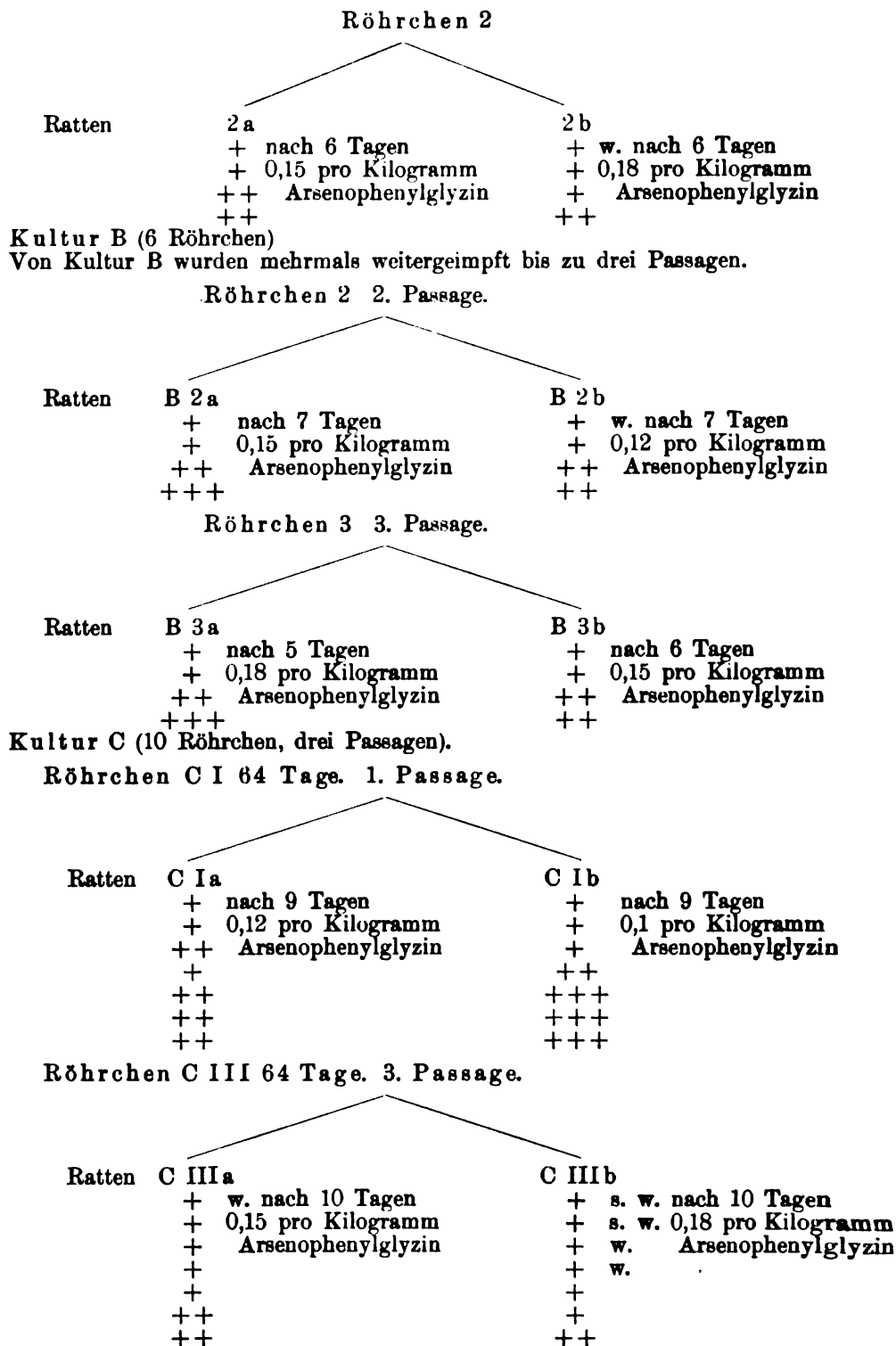
Alle Infektionen, welche durch Zurückimpfung von Kultur auf Ratte hervorgerufen wurden, meist mit einer Inkubation von 4 bis 11 Tagen, wurden in der gleichen Weise, wie die früher beschriebenen Infektionen, auf ihre Arsenfestigkeit geprüft.

Die Arsenfestigkeit hielt sich in allen Fällen.

Nachstehend erläutert eine Tabelle V die Prüfung der Infektionen, die in mehr als 100 Ratten von über 100 Kulturen arsefester Trypanosomen untersucht wurden. Die Kulturröhrchen wurden mit 3 ccm

Tabelle V.  
Kultur A (10 Röhrchen).

Röhrchen 1	
Ratten nach 7 Tagen	1 a + w. nach 8 Tagen + 0,15 pro Kilogramm ++ Arsenophenylglyzin +++
	1 b + w. nach 8 Tagen + 0,18 pro Kilogramm ++ Arsenophenylglyzin +++



physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und Ratten zu gleichen Teilen intravenös und intraperitoneal injiziert. Sobald sich die ersten Trypanosomen zeigten (+, + s. w. + w.), wurde mit Arsenophenylglyzin 1,15, 0,18 pro Kilogramm behandelt.

Da ich in den älteren Kulturen von 60 und mehr Tagen nur noch Chritdienstadien finden kann, die sich durch Zweiteilungen fortpflanzen

und auf diese Weise sich über weitere Nährbodenpassagen auch erhalten, so glaube ich einmal annehmen zu können, daß die Parthenogenese nicht für die Trypanosomenart den Regulator darstellt, wie die Befruchtung zweier geschlechtlich differenzierter Trypanosomen, und dann auch, daß in den Kulturen gar keine Befruchtung von geschlechtlich differenzierten Individuen vorkommt.

Die Ergebnisse, nochmals kurz zusammengefaßt, sind folgende:

Die Arsenfestigkeit vererbt sich in den Rattenbluttrypanosomen durch viele Passagen hindurch.

Durch *Haematopinus spinulosus* ist in seltenen Fällen eine mechanische Uebertragung möglich. Gewöhnlich bedarf *Trypanosoma Lewisi* einer Entwicklung in der Rattenlaus.

Die Entwicklung, resp. die Befruchtung in der Rattenlaus bringt die Arsenfestigkeit zum Verschwinden.

*Trypanosoma Lewisi* vererbt sich nicht durch das Ei von *Haematopinus*.

Kulturen normaler und arsenfester *Lewisii*-Trypanosomen behalten ihre Infektiosität. Die Arsenfestigkeit geht durch die Kulturen nicht verloren.

#### Literaturverzeichnis.

- Baldrey, F. S. H., Versuche und Beobachtungen über die Entwicklung von *Trypanosoma Lewisi* in der Rattenlaus. (Arch. f. Protistenk. Bd. 15. 1909.)  
 Ehrlich, P., Ueber die neuesten Ergebnisse auf dem Gebiete der Trypanosomenforschung. (Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. Bd. 13. 1909. Beiheft 6.)  
 —, Aus Theorie und Praxis der Chemotherapie. Vortrag in der 5. Tagung der freien Vereinigung f. Mikrobiologie. Leipzig (W. Klinkhardt) 1911.  
 Kudicke, R., Beiträge zur Biologie der Trypanosomen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. 1911.)  
 Patton and Strickland, A critical review of the relation of blood sucking in vertebrates to the life cycle of the Trypanosomes. (Parasitology. I. 1908.)  
 —, Parasitology. II. 1909.  
 v. Prowazek, S., Studien über Säugetiertrypanosomen. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 22. 1905.)  
 Rodenwaldt, E., *Trypanosoma Lewisi* in *Haematopinus spinulosus*. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 52. 1909.)  
 Werbitzky, Ueber blepharoplastlose Trypanosomen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 53. 1910.)

*Nachdruck verboten*

## Beiträge zur Biologie der Trypanosomen.

[Aus dem Georg Speyer-Hause zu Frankfurt a. M. (Direktor: Exz. Wirkl. Geh.-Rat Prof. Dr. P. Ehrlich).]

Von Stabsarzt Dr. R. Kudicke.

Die nachstehenden Untersuchungen sind die Frucht mehrmonatlicher Studien, die ich mit Genehmigung und unter Leitung S. Exz. Herrn Geh.-Rat Ehrlich im Georg Speyer-Hause zu Frankfurt a. M. anstellen konnte. Ich möchte S. Exzellenz auch an dieser Stelle meinen aufrichtigsten Dank dafür aussprechen.

Erste Abt. Orig. Bd. 61.

Heft 1/2.

8

Die Natur meiner Tätigkeit, die mehr eine informatorische sein sollte, sowie die ihr durch den Ablauf eines einjährigen Urlaubs gesetzte zeitliche Beschränkung brachten es mit sich, daß die Untersuchungen manche Lücke aufweisen und in keiner Weise als abgeschlossen gelten können. Da sie aber von anderen gemachte Feststellungen viel-

## Protokoll I.

Mischstamm, früher mit Oxazin behandelt. Passage 27.

Maus No. 73a, 20 g

30. 11. infiziert  
 1. 12. —  
 2. 12. +  
 3. 12. +++ **81 Proz. ohne Bleph.**  
 getötet, infiziert in 75—77

Maus No. 73b, 15 g

30. 11. infiziert  
 1. 12. —  
 2. 12. + s. wenig  
 3. 12. +++ **20 Proz. ohne Bleph.**  
 4. 12. tot

<p><b>Maus No. 75a</b>            3. 12. infiziert            4. 12. ++            getötet, infiziert in 78a, b</p> <p><b>Maus No. 78a</b>            4. 12. infiziert            5. 12. + s. wenig            6. 12. +            7. 12. +++            getötet, infiziert in 79a, b</p> <p><b>Maus No. 79a</b>            7. 12. infiziert            8. 12. + wenig            9. 12. +++            getötet, infiziert in 80—83</p> <p><b>Maus No. 82a</b>            9. 12. infiziert            10. 12. + wenig            11. 12. +++            infiziert in 84a, b</p> <p><b>Maus No. 84a</b>            11. 12. infiziert            12. 12. .            13. 12. +++            getötet, infiziert in 86a, b</p> <p><b>Maus No. 86a</b>            13. 12. infiziert            14. 12. +++            getötet, infiziert in 87a, b</p> <p><b>Maus No. 87a</b>            14. 12. infiziert            15. 12. —            16. 12. + wenig            17. 12. +++            getötet, infiziert in 89a, b</p> <p><b>Maus No. 89a</b>            17. 12. infiziert            18. 12. +            19. 12. +++ <b>7 Proz. ohne Bleph.</b>            usw.</p>	<p><b>Maus No. 77b</b>            3. 12. infiziert            4. 12. + wenig &lt; Trypanblau 1:400            5. 12. + sehr wenig            6. 12. + sehr wenig            7. 12. —            8. 12. —            9. 12. .            10. 12. + sehr wenig            11. 12. + wenig            12. 12. ++ <b>fast sämtlich ohne Blepharoblast</b>            13. 12. +++ tot, infiziert post mort. in 85a, b</p> <p><b>Maus No. 85b</b>            13. 12. infiziert            14. 12. + wenig            15. 12. +++ getötet, infiz. in 88a, b</p> <p><b>Maus No. 88b</b>            15. 12. infiziert            16. 12. + sehr wenig            17. 12. +++            18. 12. <b>sämtlich ohne Blepharoblast</b>            getötet, infiziert in 90a, b</p> <p><b>Maus No. 90b</b>            18. 12. infiziert            19. 12. +            20. 12. +++ getötet, infiz. in 92a, b</p> <p><b>Maus No. 92a.</b>            20. 12. infiziert            21. 12. + wenig            22. 12. +++ getötet, infiz. in 95a, b</p> <p><b>Maus No. 95a</b>            22. 12. infiziert            23. 12. + wenig. <b>Sämtl. ohne Bleph.</b>            24. 12. +++ <b>Sämtl. ohne Bleph.</b>            usw.</p>
--	---

fach bestätigen konnten, auch wohl einiges Neue bringen, habe ich geglaubt, mit ihrer Publikation nicht zurückhalten zu sollen.

#### Ueber blepharoblastlose Stämme, Vererbbarkeit der künstlich erzeugten Blepharoblastlosigkeit.

Ihren Ausgang nahmen die Untersuchungen von dem von F. W. Werbitzki beschriebenen blepharoblastlosen pyroninfesten Trypanosomenstamm. Dieser wurde in normalen Mäusen ohne weitere Behandlung mit Pyronin oder anderen Substanzen fortgeführt und hat seine morphologische Besonderheit 115 Passagen hindurch bewahrt. Es konnte also bestätigt werden, daß die künstlich erzeugte Blepharoblastlosigkeit dauernd vererbbar ist.

Es gelang nicht, die blepharoblastlosen Trypanosomen in morphologisch normale zurückzuverwandeln. Behandlungen mit verschiedenen Chemikalien, die aus anderen Gründen vorgenommen wurden, waren in dieser Hinsicht ebenso erfolglos wie Verimpfung auf andere Tierarten. In Mischstämmen, freilich künstlich hergestellten sowohl wie solchen, die nach vorübergehender Einwirkung orthochinoider Substanzen entstanden waren, nahmen, wie schon Werbitzki ausgeführt hat, die blepharoblastlosen Trypanosomen im Verlauf der Passageimpfungen an Zahl mehr und mehr ab und wurden schließlich ganz überwuchert. Offenbar war ihre Vitalität geringer als die der blepharoblasthaltigen. Diese Eigenschaft prägte sich auch darin aus, daß sie bei der Fortführung in weißen Mäusen gelegentlich Neigung zu spontaner Rezidivbildung zeigten, wenn nämlich bei der Uebertragung Blut verwendet wurde, das weniger Trypanosomen als gewöhnlich enthielt.

#### Entstehung blepharoblastloser Stämme aus Mischstämmen.

Aus Mischstämmen können rein blepharoblastlose auch ohne erneute Behandlung mit einem die Blepharoblasten beeinflussenden Mittel entstehen, wie vorstehender Versuch (p. 114) lehrt.

Wir sehen hier, daß es nach Injektion eines bezüglich des Blepharoblasten indifferenten Mittels zu einem Rezidiv kommt, bei dem aus dem Mischstamm ein rein blepharoblastloser wird. Der so gewonnene Stamm ließ sich 79 Generationen hindurch weiterführen, ohne von seiner Reinheit etwas einzubüßen. Es gelang nicht, Aufklärung darüber zu erhalten, unter welchen Bedingungen sich eine solche Auslese vollzieht. Der Vorgang ist von dem, der sich bei Anwendung orthochinoider Substanzen abspielt, wohl zu unterscheiden. Im letzteren Falle handelt es sich um direkte Einwirkung der betreffenden Mittel auf den Blepharoblasten, wie ich an Rattentrypanosomen zeigen konnte.

#### Rapide Arsenfestigung nach Behandlung normaler Stämme mit orthochinoiden Substanzen.

Bekanntlich sind die gegen orthochinoide Substanzen gefestigten Trypanosomen auch relativ fest gegenüber Arsenikalien. In dieser Hinsicht ist ein Versuch von Interesse, bei dem ein Trypanosomenstamm nach einmaliger Behandlung mit Acridin Arsenfestigkeit erwarb.

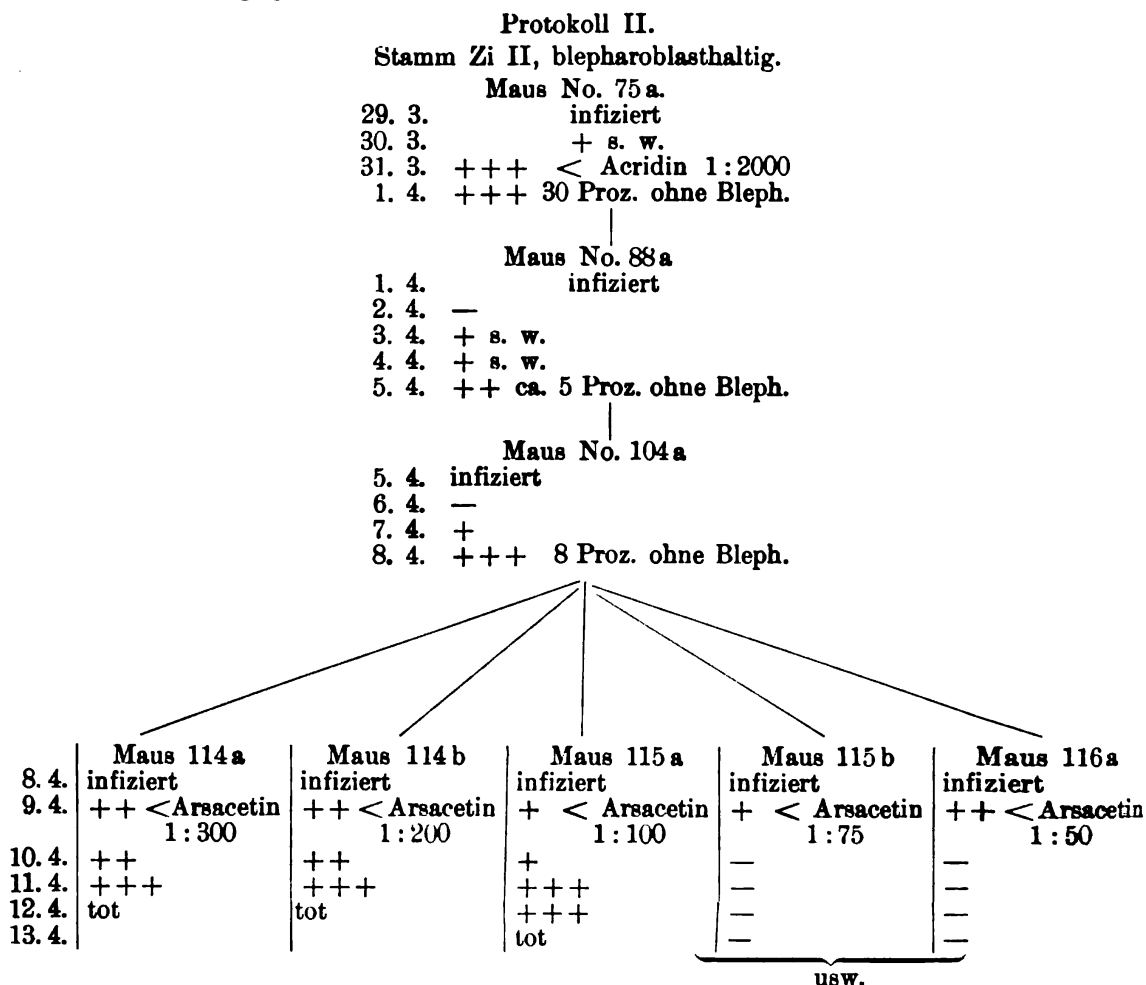
Normalstämme werden nach den im Georg Speyer-Hause gemachten Erfahrungen durch Arsacetin in der Verdünnung 1:200 am ersten Tage nach der Infektion abgetötet. Im vorliegenden Falle vermochte die doppelte Dosis die Vermehrung der Trypanosomen nicht zu verhindern.

Die Beobachtung derartig rapider Festigung von Trypanosomen gegen Arsenikalien war im Georg Speyer-Hause schon früher mehrfach gemacht worden. Die Ursache hat sich meines Wissens bisher nicht ergründen lassen. Im Falle des Acridins tritt die Festigung keineswegs immer ein, wie eine Wiederholung des Versuches ergab.

### Immunisatorisches Verhalten blepharoblastloser Stämme. Rezidivstammbildung.

Im Hinblick darauf, daß die Eigenschaft der Blepharoblastlosigkeit dauernd vererbbar war, eine Eigenschaft, die wohl geeignet erschien, den Trypanosomen den Stempel einer neuen Art aufzudrücken, schien es nicht unwichtig, festzustellen, wie sich diese Trypanosomen in ihren immunisatorischen Eigenschaften verhielten. Von anderer Seite war bereits nachgewiesen worden, daß der Pyroninstamm immunisatorisch übereinstimmte mit dem blepharoblasthaltigen Rezidivstamm 3, der auf dem von Ehrlich angegebenen Wege aus dem Naganastamm Ferox entstanden war, d. h. der Pyroninstamm immunisierte Mäuse gegen den blepharoblasthaltigen und umgekehrt.

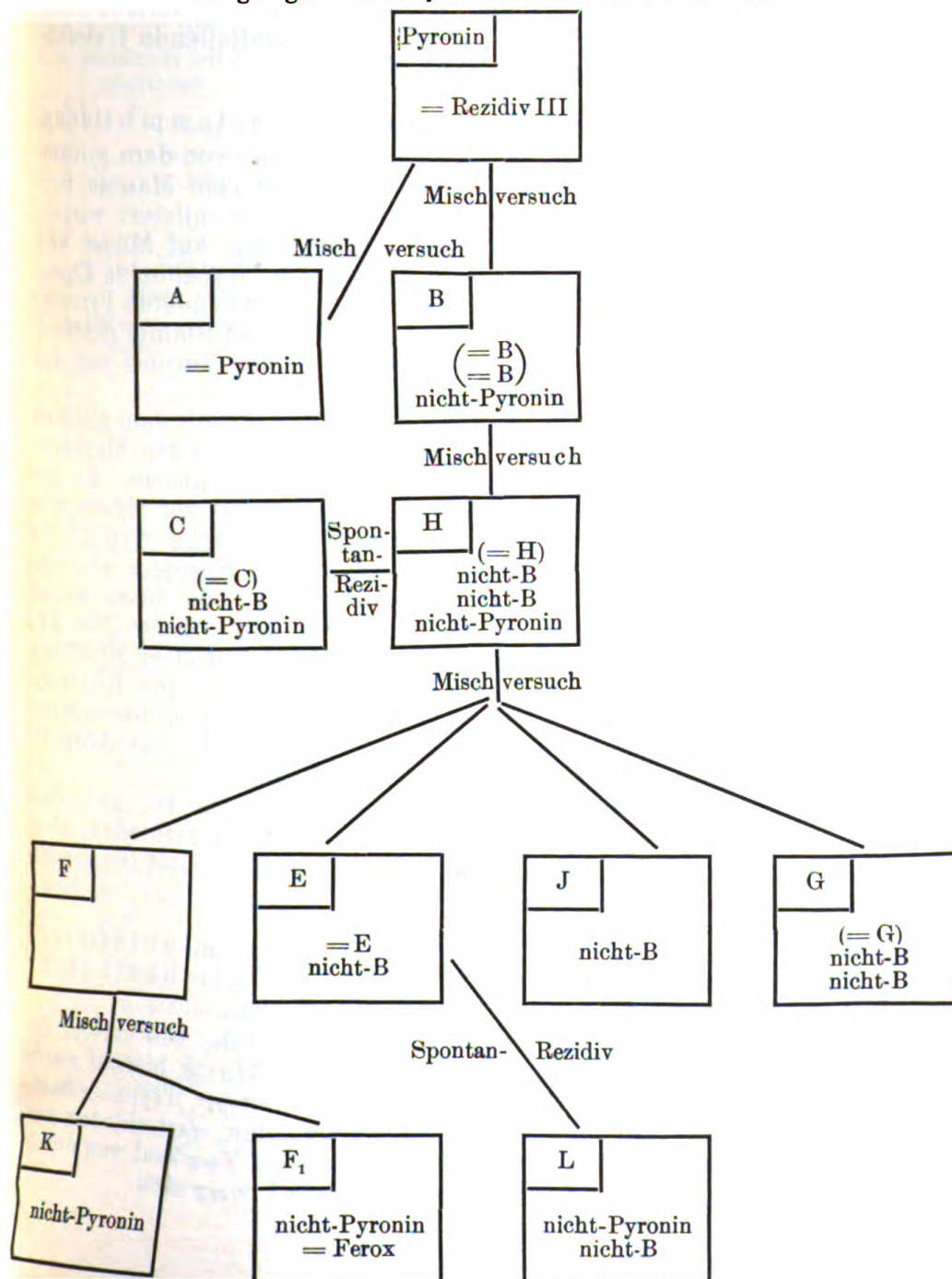
Ich selbst erhielt bei anderer Gelegenheit — Mischung des Pyroninstammes in vitro mit Pyronin und Injektion des Gemisches in Mäuse — eine Reihe von Stämmen, deren Zusammenhang und immunisatorische Eigenschaften, soweit sie sich feststellen ließen, in nachstehendem Stammbaum wiedergegeben sind.



Wie ersichtlich, wurde ein Teil der Stämme zunächst auf Reinheit geprüft. Durch Reinjektionen mit den Stämmen „Pyronin“ und „B“ wurde dann festgestellt, wie sich die erhaltenen Stämme zu diesen verhielten. Es konnte nachgewiesen werden, daß eine ganze Anzahl der Stämme mit dem Mutterstamme nicht mehr im Rezeptor übereinstimmte. Bei einem Stamm „F“ konnte seine (immunisatorische) Identität mit Ferox erwiesen werden.

## Protokoll III.

Bildung von Rezidivstämmen aus Stamm „Pyronin“ durch Mischung mit Pyronin im Reagensglase und Injektion der Gemische in Mäuse.





Die blepharoplastlosen Trypanosomen zeigen also die gleiche Variabilität wie die morphologisch normalen. Und nicht nur das, sondern es läßt sich auch mit blepharoplastlosen Trypanosomen gegen blepharoplasthaltige immunisieren (umgekehrt natürlich ebenfalls), vorausgesetzt nur, daß man die einander entsprechenden Stämme verwendet.

Der Verlust des Blepharoplasten oder eines großen Teiles desselben hat also, wie er die Vermehrungs- und Bewegungsfähigkeit nicht beeinflusste, auch die chemische Konstitution, soweit wir auf dieselbe aus der Immunitätsreaktion Schlüsse ziehen dürfen, nicht verändert. Wir würden sonach kaum berechtigt sein, den blepharoplastlosen Trypanosomen Arteigenschaften zuzuerkennen, um so weniger, als weitere Untersuchungen lehrten, daß sie auch in anderer Hinsicht auffallende Uebereinstimmung mit den blepharoplasthaltigen zeigten.

#### Aenderung der Pathogenität durch Rezidivstammbildung

Auch diese Untersuchungen nahmen ihren Ausgang von dem pyronin-festen Trypanosomenstamm. Mit diesem, der in weißen Mäusen fortgezüchtet wurde, war eine Ziege (No. III) intravenös injiziert worden. Das Blut dieses Tieres erwies sich bei Rückimpfung auf Mäuse und Ratten als nicht infektiös. Das Serum hatte aber trypanozide Eigenschaften gewonnen, die sich gegen den zur Injektion verwendeten Pyroninstamm bzw. gegen den homologen blepharoplasthaltigen Stamm richteten (Rezidivstamm 3). — Ueber andere Eigenschaften des Serums und des Blutes dieser Ziege weiter unten.

Der Versuch wurde an einer zweiten Ziege (No. V) mit dem gleichen Stamm, an einer dritten (No. VIII) mit dem entsprechenden blepharoplasthaltigen wiederholt. Der Erfolg war durchaus der gleiche. Es gelang nicht, die Ziegen zu infizieren, wie Rückimpfungen auf Mäuse und Ratten ergaben. Auch hier hatte das Serum erhebliche trypanozide Eigenschaften, gerichtet gegen die beiden in ihrem Rezeptor übereinstimmenden Stämme, und die anderen Besonderheiten, von denen weiter unten die Rede sein soll. Zur Kontrolle wurde eine Ziege (No. IV) mit dem Naganastamm „Ferox“, eine dritte (No. VII) mit einer Mischung verschiedener, aus Ferox entstandener Stämme infiziert. Die Kontrolltiere erkrankten, ihr Blut war für Mäuse infektiös, die anderen besonderen Eigenschaften fehlten ihnen, der Gehalt an trypanoziden Antikörpern erwies sich da, wo er geprüft werden konnte, als gering.

Wir haben also die weitere bemerkenswerte Tatsache vor uns, daß zwei Trypanosomenstämme morphologisch voneinander verschieden, aber in ihrem Rezeptor identisch, bezüglich ihrer Nichtpathogenität für Ziegen übereinstimmen.

#### Nachweis trypanozider Antikörper im Serum uninfizierbarer Tiere. Spezifität dieser Körper. Möglichkeit ihrer therapeutischen Verwendung.

Im Serum der Ziegen III, V und VIII ließen sich, wie bereits angegeben, trypanozide Antikörper nachweisen. Die Prüfung hierauf wurde in der Weise vorgenommen, daß gleiche Mengen einer Trypanosomenaufschwemmung (0,2) mit entsprechenden Mengen des verschieden verdünnten Serums im Reagensglase gemischt und nach Verlauf von durchschnittlich 10–15 Minuten in weiße Mäuse injiziert wurden.

## Protokoll IV.

Identifizierung eines Pyroninrezidivstammes (F<sub>1</sub>) mit „Ferox“.1) Stamm F<sub>1</sub> identisch mit Pyroninrezidivstamm II.

Datum	Maus No. 57 a	Maus No. 57 b	Maus No. 58 a	Maus No. 58 b
15. 3.	infiziert	infiziert	infiziert	infiziert
16. 3.	+ s. w.	+ s. wenig	—	—
17. 3.	++ < Arsenophgl. 1:150	++ < Arsenophgl. 1:150	++ < Arsenophgl. 1:150	++ < Arsenophgl. 1:150
18. 3.	—	—	—	—
19. 3.	—	—	—	—
20. 3.	— usw.	— usw.	— usw.	— usw.
27. 4.	reinfiziert mit Pyro- ninstamm	reinfiziert mit Pyro- ninstamm	reinfiziert mit Pyro- nirezidivstamm II	reinfiziert mit Pyro- nirezidivstamm II
28. 4.	—	—	—	—
29. 4.	+ wenig	+ wenig	—	—
30. 4.	+++	+++	—	—
1. 5.	tot	+++	—	—
2. 5.	.	tot	—	—
3. 5.	.	.	— usw.	— usw.
	Kontrollen zu No. 57 a, b		Kontrollen zu No. 58 a, b	
	Maus 186 a	Maus 186 b	Maus 185 a	Maus 185 b
27. 4.	infiziert (Pyronin- stamm)	infiziert (Pyronin- stamm)	infiziert (Pyronin- rezidivstamm II)	infiziert (Pyronin- rezidivstamm II)
28. 4.	—	—	+ s. wenig	—
29. 4.	+ wenig	+	+	+ wenig
30. 4.	+++ getötet	+++	+++ getötet	+++
1. 5.	.	tot	.	tot

2) Pyroninrezidivstamm II identisch mit „Ferox“.

Dat.	Maus 145 a	Maus 145 b	Maus 147 a	Dat.	Maus 19 a	Maus 19 b
11. 2.	inf. m. Rez.-St. II	inf. m. Rez.-St. II	inf. m. Rez.-St. III	1. 3.	infiz. m. Ferox	infiz. m. Ferox
12. 2.	+ wenig	+ wenig	+ wenig	2. 3.	+ s. wenig	+ s. wenig
13. 2.	+++ Arseno-phenylgl. 1:200	+++ Arseno-phenylgl. 1:200	+++ Arseno-phenylgl. 1:200	3. 3.	+++ Arsphgl. 1:200	+++ Arsphgl. 1:200
14. 2.	+ s. wenig	—	—	4. 3.	—	—
15. 2.	—	—	—	5. 3.	—	—
16. 2.	—	—	—	6. 3.	—	—
17. 2.	—	—	—	7. 3.	—	—
18. 2.	—	—	—	8. 3.	—	—
19. 2.	—	—	—	9. 3.	—	—
20. 2.	—	—	—	10. 3.	— usw,	— usw.
21. 2.	—	—	—	15. 3.	— reinf. m. Pyroninrezidiv II	— reinf. m. Pyroninrezidiv II
22. 2.	— reinf. m. Pyroninrezidiv II	— reinf. m. Pyroninrezidiv II	— reinf. m. Pyroninrezidiv II	16. 3.	—	—
23. 2.	++	++	++	17. 3.	—	—
24. 2.	+++	+++	+++	18. 3.	—	—
25. 2.	tot	tot	tot	19. 3.	—	—
Kontrollen zu 145 a, b; 147 a, b				20. 3.	—	—
Maus 184 a				21. 3.	+ s. wenig	—
Maus 184 b				22. 3.	+ wenig	+ s. wenig
22. 2.	inf. m. Pyroninrezidiv II	22. 2. wie a	23. 2. +	23. 3.	—	++
23. 2.	+	24. 2. + wenig	25. 2. + wenig	24. 3.	— usw.	+++ getötet
24. 2.	+++	26. 2. +++	27. 2. +++	Kontrollen zu 19 a, b		
		28. 2. tot		Maus 47 a		
				15. 3.	inf. Pyrrez. II	15. 3. inf. Pyrrez. II
				16. 3.	++ sämtlich ohneBlephar. getötet	16. 3. ++
				17. 3.	++	17. 3. +++
				18. 3.	tot	18. 3. tot

## Protokoll V.

Ziege IV, infiziert 13. 12. 09 mit Stamm *Ferox* aus einer Maus.

8. Tag nach der Infektion.

21. 12. 3 Mäuse erhalten je 1 ccm defibriertes Blut von Ziege IV subkutan.

	a)	b)	c)
22. 12.	neg.	neg.	neg.
23. 12.	"	"	"
24. 12.	"	"	"
25. 12.	"	"	"
26. 12.	+	"	"
27. 12.	+++	"	"
28. 12.	tot	"	"
		usw.	usw.

23. Tag nach der Infektion.

5. 1. 8 Mäuse erhalten je 1,0—1,5 ccm defibriertes Blut subkutan.

	a) 1,0	b) 1,0	c) 1,2	d) 1,2	e) 1,5 usw.
6. 1.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
7. 1.	"	"	"	"	"
8. 1.	"	"	+ s. w.	"	+ s. w.
9. 1.	++	+	++	++	+++
10. 1.	+++	+++	+++	+++	tot
11. 1.	tot	tot	tot	tot	.

Ziege VII, infiziert 30. 12. 09 mit Mischstamm aus 4 Mäusen.

7. Tag nach der Infektion.

6. 1. 8 Mäuse erhalten je 1,0—1,5 ccm defibriertes Blut subkutan.

	a) 1,0	b) 1,0	c) 1,25	d) 1,25	e) 1,5	f) 1,5	g) 1,5	h) 1,5
7. 1.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
8. 1.	"	"	"	"	"	"	"	"
9. 1.	+ s. w.	+ s. w.	+ w.	"	"	+ s. w.	+ s. w.	+ s. w.
10. 1.	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++
11. 1.	tot	+++	tot	tot	+++	tot	+++	tot
12. 1.	.	tot	.	.	tot	.	tot	.

## Protokoll VI.

Serum Ziege III, geprüft gegen Stamm *Pyronin*.

Tryp.-Aufschw.: Blut einer Maus mit mehr als 10 Tryp. im Gesichtsfeld (Obj. DD Ok. 2), verdünnt mit 10 ccm 0,85-proz. NaCl-Lösung.

Datum	Serum vom 17. 1. 10.						Serum vom 18. 2. 10.					
	Gewicht der Maus						Gewicht der Maus					
	13	13	13	13	12	12	12	12	12	12	12	12
	Serummengue						Serummengue					
	0,1	0,2	0,05	0,05	0,025	0,025	0,1	0,1	0,05	0,05	0,025	0,025
10. 5.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.
11. 5.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12. 5.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+ w.	+ w.
13. 5.	—	—	—	—	—	+ s. w.	—	—	tot	++	+++	+++
14. 5.	—	—	tot	—	—	+ w.	+ w.	—	.	+++	tot	tot
15. 5.	tot	—	.	—	+ s. w.	+++	++	++	.	tot	.	.
16. 5.	.	—	.	—	tot	tot	tot	+++	.	.	.	.
17. 5.	.	—	.	—	.	.	.	tot	.	.	.	.
18. 5.	.	—	.	—	.	.	.	.	.	.	.	.
19. 5.	.	—	.	—	.	.	.	.	.	.	.	.
20. 5.	.	—	.	—	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	usw.	.	usw.	.	.	.	.	.	.	.	.

Datum	Serum vom 10. 3. 10.						Kontrollen (statt des Serums 0,85-proz. Kochsalzlösung).	
	Gewicht der Maus						Gewicht der Maus	
	12	12	12	12	12	12	12	12
	Serummenge						Serummenge	
	0,1	0,1	0,05	0,05	0,025	0,025	—	—
10. 5.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.
11. 5.	—	—	—	—	—	—	—	—
12. 5.	—	—	+ s. w.	+ w.	+ s. w.	++	+ w.	+ w.
13. 5.	—	—	+++	+++	tot	+++	+++	+++
14. 5.	+ w.	+ w.	+++	tot	.	tot	tot	tot
15. 5.	+++	tot	tot	.	.	.	.	.
16. 5.	tot	.	.	.	.	.	.	.

## Protokoll VII.

Serum Ziege V vom 17. 1. 10. geprüft gegen verschiedene Trypanosomenstämme.

Datum	a) Stamm Ferox				b) Rezidivstamm 3				c) Rezidivstamm 2			
	Gewicht der Maus				Gewicht der Maus				Gewicht der Maus			
	22	20	18	16	18	14	22	17	15	15	18	18
	Serummenge				Serummenge				Serummenge			
	0,2	0,2	Kontr. mit NaCl-Lösung		0,1	0,1	Kontr. mit NaCl-Lösung		0,1	0,1	Kontr. mit NaCl-Lösung	
28. 1.	inf.	inf.	inf.	inf.	—	—	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.
29. 1.	+ w.	+ w.	+ w.	+ w.	—	—	+ s. w.	+ w.	+ s. w.	+ s. w.	—	+ s. w.
30. 1.	+++	+++	+++	+++	—	—	++	++	++	++	++	++
31. 1.	tot	tot	tot	tot	negativ bis 23. 2. reinf. mit Rezidivstamm 3				tot	+++	+++	+++
1. 2.	.	.	.	.	.	.	tot	tot	.	tot	tot	tot
.	.	.	.	.	24. 2.	+ s. w.	+ s. w.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	25. 2.	+++	+++	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	26. 2.	tot	+++	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	27. 2.	.	tot	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	nichtimmun				.	.	.	.

Datum	d) Rezidivstamm 1				e) Stamm Zi II				f) Stamm Zi II a			
	Gewicht der Maus				Gewicht der Maus				Gewicht der Maus			
	20	15	17	15	14	14	14	14	16	16	15	15
	Serummenge				Serummenge				Serummenge			
	0,1	0,1	Kontr. mit NaCl-Lösung		0,1	0,1	Kontrollen		0,1	0,1	Kontrollen	
28. 1.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.
29. 1.	—	—	+ w.	+ w.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.
30. 1.	—	—	+++	+++	—	+ s. w.	+ w.	+ w.	+ w.	+ w.	+ w.	+ w.
31. 1.	++	+ w.	tot	tot	++	++	+++	+++	++	+++	++	+++
1. 2.	+++	++	.	.	+++	tot	+++	tot	tot	+++	tot	tot
2. 2.	tot	+++	.	.	tot	.	tot	.	.	tot	.	.
3. 2.	.	tot	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Protokoll VIII.  
Serum Ziege V vom 17. 1. 10, ausgewertet gegen Serum „Pyronin“.

Datum	Gewicht der Maus										
	13,5	13	13	12	12	12	12	12	11,5	11	11
	Serummengen										
	0,00625	0,00625	0,0125	0,0125	0,025	0,025	0,05	0,05	0,1	0,1	Kontrollen mit NaCl-Lösung
24. 1.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.
25. 1.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+ s. w.
26. 1.	+ w.	+ s. w.	—	—	—	—	—	—	—	—	++
27. 1.	+++	+++	++	++	+ s. w.	—	—	—	—	—	+ s. w.
28. 1.	tot	tot	+++	+++	++	+	—	—	—	—	tot
29. 1.	.	.	tot	tot	+++ <sup>1)</sup>	+++	+ s. w.	—	—	—	.
30. 1.	.	.	.	.	tot	tot	++	—	—	—	.
31. 1.	.	.	.	.	.	.	+++	neg. bis 24. 2. reinfiz. mit Pyronin-stamm	neg. bis 24. 2. reinfiz. mit Pyronin-stamm	—	.
1. 2.	.	.	.	.	.	.	tot	25. 2. ++	+	+	3. 2. + s. w.
.	.	.	.	.	.	.	.	26. 2. +++	+++	+++	4. 2. +
.	.	.	.	.	.	.	.	27. 2. tot	tot	tot	5. 2. +++
.	.	.	.	.	.	.	.				6. 2. tot

Normalziegenserum, geprüft gegen Pyroninstamm.

Datum	Gewicht der Maus			
	15	14	14	14
	Serummengen			
	0,1	0,1	0,2	0,2
24. 1.	inf.	inf.	inf.	inf.
25. 1.	+ s. w.	+ s. w.	—	+ s. w.
26. 1.	++	++	++	++
27. 1.	+++	+++	+++	+++
28. 1.	tot	+++	tot	tot
29. 1.	.	+++	.	.
30. 1.	.	tot	.	.

Protokoll IX.  
Serum Ziege VIII, geprüft gegen Rezidivstamm 3.

Datum	Serum vom 4. 2. 10.							
	a	b	c	d	e	f	g	h
	Gewicht der Maus							
	12	12	12	12	12	12	11	11
	Serummengen							
	0,1	0,1	0,05	0,05	0,025	0,025	Kontrollen	
12. 5.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.
13. 5.	—	—	—	—	—	—	—	—
14. 5.	—	—	—	—	+ w.	—	+ w.	+ w.
15. 5.	—	—	—	+ w.	++	—	+++	+++
16. 5.	—	—	—	+++	+++	—	tot	tot
17. 5.	—	—	—	+++	tot	—	.	.
18. 5.	—	—	—	tot	.	—	.	.
19. 5.	—	—	+ w.	.	.	—	.	.
20. 5.	—	—	++	.	.	—	.	.
21. 5.	—	—	+++	.	.	—	.	.
22. 5.	.	.	+++	.	.	—	.	.
23. 5.	—	—	+++	.	.	—	.	.
24. 5.	—	—	+++	.	.	—	.	.
25. 5.	.	.	tot	.	.	.	.	.

1) Weitergeführt, geprüft gegen Pyronin. Identisch.

Original from  
COLUMBIA UNIVERSITY

Datum	Serum vom 18. 2. 10.						Serum vom 10. 3. 10. <sup>1)</sup>					
	i	k	l	m	n	o	p	q	r	s	t	u
	Gewicht der Maus						Gewicht der Maus					
	11	11	12	12	12	12	11	11	13	13	13	13
	Serummenge						Serummenge					
	0,1	0,1	0,05	0,05	0,025	0,025	0,1	0,1	0,05	0,05	0,025	0,025
12. 5.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.
13. 5.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
14. 5.	—	—	—	—	+ w.	+ s. w.	—	—	—	—	—	—
15. 5.	—	—	—	—	+++	+	—	—	—	—	—	—
16. 5.	—	—	—	—	tot	+++	—	—	—	—	—	—
17. 5.	—	—	—	—	.	tot	—	—	—	—	—	—
18. 5.	—	—	—	—	.	.	—	—	—	—	—	—
19. 5.	—	—	—	—	.	.	—	—	—	—	—	—
20. 5.	—	—	—	—	.	.	—	—	—	—	—	—
21. 5.	—	—	—	—	.	.	—	—	—	—	—	—
22. 5.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
23. 5.	—	—	—	—	.	.	—	—	—	—	—	—
24. 5.	—	—	—	—	.	.	—	—	—	—	—	tot

Aus den Protokollen ergibt sich, daß in einzelnen Fällen noch 0,05—0,025 Serum bei dieser Versuchsanordnung gegen 0,2 Trypanosomenaufschwemmung schützte, die die Kontrollen innerhalb 3—4 Tagen tötete. In anderen Fällen war die Schutzwirkung weniger ausgesprochen. Aber auch hier ließ sich die Gegenwart von Antikörpern erweisen. Vielfach erschienen nämlich die Trypanosomen mit verlängerter Inkubationszeit im Blut. Drei der so entstandenen Stämme wurden weiter gezüchtet. Bei zweien ließ sich durch die Immunitätsreaktion nachweisen, daß sie von dem Ausgangsstamm (Pyronin) verschieden waren, während der dritte bezüglich seines Rezeptors mit „Ferox“ identifiziert werden konnte (s. Protokoll IV, Pyroninrezidivstamm 2).

Aus den Versuchen geht ferner hervor, daß die gebildeten Antikörper spezifisch waren, d. h. in stärkerem Maße nur auf den Stamm wirkten, der zur Injektion Verwendung gefunden hatte. Protokoll VII zeigt, daß die nach Injektion eines blepharoplastlosen Stammes entstandenen Antikörper auch gegen den homologen blepharoplasthaltigen gerichtet waren. Die Tatsache der Antikörperbildung gegen Trypanosomen ist lange bekannt. Das Gebiet der Immunotherapie bei Trypanosomenkrankheiten hat aber, nachdem die ersten Versuche fehlgeschlagen waren, lange brach gelegen. Was die Ursache der Mißerfolge war, haben P. Ehrlich und seine Mitarbeiter Röhl und Frl. Gulbranson gezeigt, indem sie nachwiesen, daß sich aus einem Ausgangsstamm eine große Anzahl von Rezidivstämmen herstellen läßt, die vom Mutterstamm und voneinander sich in ihrem immunisatorischen Verhalten unterscheiden. Die sogenannte Serumfestigkeit der Trypanosomen beruht einerseits auf der strengen Spezifität der gebildeten Antikörper, andererseits auf der weitgehenden Variabilität der Trypanosomen. Nach den mitgeteilten Versuchen ist anzunehmen, daß auch die Sera, die sich etwa durch Verwendung von abgetöteten Trypanosomen erzielen lassen — ich persönlich glaube, daß das ein durchaus gangbarer Weg ist — den gleichen Spezifitätsgesetzen folgen. Es ist darum nicht wahrscheinlich, daß ein auf einen Stamm eingestelltes Serum therapeutisch verwendbar ist, oder daß man mit dem Extrakt eines Trypanosomenstammes immunisieren

1) Kontrollen siehe g und h.



kann. Daß das unmöglich ist, geht aus neueren Versuchen von R. Ross und D. Thomson hervor, die aus den Trypanosomen eines Schlafkranken Extrakte herstellten und mit diesen den Kranken behandelten. Aus der Arbeit läßt sich nicht ersehen, ob zur Bereitung der Extrakte immer derselbe Trypanosomenstamm verwendet wurde. Wenn das der Fall gewesen ist, kann ein Mißerfolg nicht wundernehmen. Denn angenommen, daß der Impfstoff hergestellt ist aus den Trypanosomen des Rezidivs a, so würde er nur die Bildung von gegen a-Trypanosomen gerichteten Antikörpern veranlassen können. Im Moment, wo dieses eintritt, hat der Kranke aber den Anfall a schon selbst überwunden. Trypanosomen, die durch a-Antikörper beeinflusbar sind, sind dann aller Wahrscheinlichkeit nach nicht mehr vorhanden, die im nächsten Rezidiv b auftretenden sind gegen a-Antikörper sicher resistent. Trotzdem glaube ich, daß der Weg der Immunotherapie doch vielleicht mit Erfolg beschritten werden könnte. Man muß sich nur der Grenzen, die dieser Behandlungsweise gezogen sind, bewußt sein. Da wiederholte Seruminjektionen wegen der Möglichkeit der Ausbildung anaphylaktischer Zustände nicht anwendbar sind, wird es geraten sein, Sera zu verwenden, die gegen möglichst viele Trypanosomenstämme (Stämme im Sinne Ehrlichs) gerichtet sind, und auch diese möglichst in Kombination mit Chemikalien. Auch bei Verwendung von Trypanosomenextrakten wird man der Variabilität der Trypanosomen Rechnung tragen müssen. Vielleicht eignen sich diese mehr zu prophylaktischer Immunisierung oder zur Nachbehandlung. Es ist wohl möglich, daß auch die mit chemotherapeutischen Maßnahmen kombinierte Immunotherapie, beispielsweise bei der Schlafkrankheit, in den zahlreichen Fällen nicht zum Ziele führt, die Trypanosomen in der Cerebrospinalflüssigkeit haben. Meiner Ansicht nach kann nur das Experiment darüber Aufschluß geben, und ich halte deswegen weitere Versuche in der angedeuteten Richtung für wünschenswert. Diese Ansicht gründet sich auf Erfahrungen, die im Georg Speyer-Haus vielfach gemacht worden sind und von deren Richtigkeit man sich leicht überzeugen kann. Heilt man Mäuse auf der Höhe der Infektion mit einem Chemikale und reinfiziert mit dem gleichen Stamm etwa nach 2 Tagen, so geht die Infektion vielfach nicht an, reinfiziert man später, etwa nach 4—6 Tagen, so erhält man in der Regel nach verlängerter Inkubationszeit einen Rezidivstamm. Im ersteren Falle handelt es sich offenbar um die Wirkung von Chemikalien + Antikörper, im letzteren um Antikörperwirkung allein. Der Wert der Kombination ergibt sich daraus von selber. Tatsächlich arbeiten wir ja bei unseren therapeutischen Versuchen mit dieser Kombination, wir überlassen es nur dem Körper, die Schutzstoffe zu bilden, und in gewisser Hinsicht dem Zufall, insofern nämlich, als z. B. bei der Schlafkrankheit meist wohl Beginn der Behandlung nicht gerade mit der Anwesenheit von Trypanosomen im Blut zusammenfällt, was auf die Zahl der gebildeten Antikörper nicht ohne Einfluß ist.

Ich möchte aus dem bisher Gesagten das Folgende herausheben: Es konnte festgestellt werden, daß 1) morphologisch-differente — durch das verschiedene Verhalten des Blepharoblasten stets unterscheidbare — Trypanosomen sich immunisatorisch völlig gleich verhalten können; 2) daß Rezidivstämme sich in ihrer Pathogenität vom Ausgangstamm unterscheiden können; 3) daß Rezidivstämme, die diese Eigenschaft haben, sich in ihren Ausgangsstamm zurück-



verwandeln lassen; 4) daß trypanozide Stoffe nach Injektion trypanosomenhaltigen Materials entstehen, auch wenn die Trypanosomen sich in dem betreffenden Tier nicht zu entwickeln vermögen.

Aus Punkt 2 und 4 geht hervor, daß die Fähigkeit, Antikörper auszulösen, unabhängig ist von Nutritionsvermögen und Pathogenität. Für Punkt 3 mag vielleicht manchem ein vollgütiger Beweis so lange nicht erbracht scheinen, als es nicht gelungen ist, die Ziegenpathogenität des wieder zu Ferox gewordenen Rezidivstammes 3 bzw. des Pyroninstammes, der die entsprechende Umwandlung erfahren hat, zu erweisen. Mir fehlte dazu die Zeit. Aber ich muß sagen, daß ich nicht daran zweifle, daß sich ein solcher Beweis führen läßt, da ja offenbar die Nichtpathogenität an den Rezeptor gebunden ist.

### **Hämolyse in vivo, hervorgerufen bei Mäusen durch Blut und Serum von Ziegen, die mit trypanosomenhaltigem Mäuseblut vorbehandelt waren.**

Bei Gelegenheit der Ziegenversuche war davon die Rede, daß Blut und Serum einzelner Ziegen durch die Vorbehandlung mit trypanosomenhaltigem Mäuseblut besondere Eigenschaften gewonnen hatte. Es handelte sich um die Fähigkeit, bei Mäusen bei subkutaner Injektion Hämoglobinurie und den Tod zu verursachen. Diese Fähigkeit kam nur dem Blut und Serum der Ziegen zu, die im Mäuseblut den Pyroninstamm oder den Rezidivstamm 3 erhalten hatten. Die Mäuse erkrankten nach 18—24 Stunden, saßen still und zitternd mit gesträubtem Fell auf einem Fleck, ihre Haut wurde blaß, dann blaßgelb und schließlich stark ikterisch. Der spontan oder durch den Druck auf die Blasengegend entleerte Urin war anfangs blaßrot, wurde dann dunkler und in allen schweren Fällen schwarzrot bis braunschwarz. Er enthielt keine Erythrocyten. Meist gingen die Tiere innerhalb weniger Tage zugrunde. Nie zeigten die mit dem Blut der betreffenden Ziegen gespritzten Mäuse Trypanosomen, auch dann nicht, wenn sie die Hämoglobinurie überstanden oder etwa eine Blutdosis erhalten hatten, die zur Hämoglobinurie nicht führte. Denn das Eintreten der Hämoglobinurie war an eine bestimmte Dosis geknüpft, deren Höhe wechselte je nach der Zeit, die nach der Injektion der Ziege verfloßen war. Die kleinste Dosis, mit der die Erscheinung hervorgerufen werden konnte, betrug 0,5 Serum auf 20,0 g Maus. 32 Tage später wirkten 2,0 g des Serums derselben Ziege auf 20,0 g Maus nicht mehr, wohl aber 4,0. Die gleiche Menge normalen Ziegenserums hatte keine hämolytische Eigenschaft in vivo. Das Blut der Ziege gewann seine besonderen Eigenschaften erst einige Zeit nach der Injektion der Ziege. Der früheste Termin, an dem sie nachgewiesen werden konnten, war der 10. Tag nach der Injektion. Nach Ablauf einer gewissen Zeit verlor sich die Fähigkeit wieder, indem immer größere Dosen zur Erzielung des Phänomens verwendet werden mußten. Nur bei Mäusen trat nach Injektion von Ziegenblut Hämoglobinurie ein, gleichzeitig gespritzte Ratten blieben vollkommen gesund, wobei allerdings zu bemerken ist, daß es nicht möglich war, ihnen die gleich hohen Dosen zu geben wie den Mäusen. Aber auch die Ratten wurden durch die Blutinjektion nicht infiziert. Mit Blut oder Serum der beiden Kontrollziegen, deren Blut für Mäuse infektiös war, gelang es nicht, die Erscheinung hervorzurufen, obgleich das Serum dieser Ziegen in vitro den gleichen hämolytischen Titer hatte, wie Versuche ergaben, die Herr Dr. Ritz anzustellen die Freundlichkeit hatte.

## Protokoll X.

Datum	Tag nach der Injektion	Hämolyse in Mäusen			Hämol. v. Mäuseblut in vitro 1 ccm 5-proz. Blut + 0,1 Kompl.	Infektiosität	Trypanozide Kraft im Mischversuch gegen 0,2 Tryp.-Aufschwemmung
		Zahld. Mäuse	Dosis	Ergebnis			
Ziege III. 40,5 kg, 11. 12. 10 injiz. intravenös Blut einer Maus, Pyroninstamm.							
21. 12. 09	10.	4	1 ccm Blut	pos.		neg.	
24. 12. 09	13.	2	1,25 Blut auf 20 g	pos.		neg. } 2 Ratten	
		8	0,63—0,77 Blut auf 20 g	neg.		neg. } 1 ccm Blut	
						neg. } intraperitoneal	
						bei 30-tägiger tägl. Untersuchung	
8. 1. 10	28.	4	1,05—1,54 Blut auf 20 g	neg.		neg., 2 Ratten 2 ccm Blut intraperitoneal neg.	
17. 1. 10	37.	8	0,7—1,95 Ser. auf 20 g	neg.	0,1 Serum löst komplett		0,1—0,05 Serum schützt
18. 2. 10	69.	9	0,5—1,5—2,0 Ser. auf 20 g	neg.	0,25 Serum löst wenig		0,1 Ser. verläng. Inkub.-Zeit 2—3 Tag. 0,05 Ser. verläng. Inkub.-Zeit 1 Tag
Ziege V. 44,0 kg, 27. 12. 09 injiz. intravenös Blut von 4 Mäusen, Pyroninstamm.							
3. 1. 10	7.	4	0,33—1,92 Blut auf 20 g	neg.	0,1 Serum löst komplett	neg., 2 Ratten 2 ccm Blut intraperitoneal neg.	
8. 1. 10	12.	4	1,54—2,0 Blut auf 20 g	pos.	—	neg.	
12. 1. 10	16.	4	1,43—1,88 Blut auf 20 g	pos.	—	neg.	
17. 1. 10	21.	18	0,38 Serum auf 20 g	neg.	0,1 Serum löst komplett	—	0,1—0,05 Serum schützt
			0,5—1,92 Ser. auf 20 g	pos.			0,025 Ser. verläng. Inkub.-Zeit 2 Tag
18. 2. 10	53.	2	2,0 Serum auf 20 g	neg.	0,25 Serum löst nicht mehr	—	0,1—0,05 Serum schützt
		2	4,0 Serum auf 20 g	pos.			
Ziege VIII. 51,0 kg, 22. 1. 10, injiz. intravenös Blut von 4 Mäusen, Rezidivstamm 3.							
26. 1. 10	4.	2	1,66 } Ser. auf 20 g	neg.		neg., 2 Ratten 2 ccm Blut intraperitoneal neg.	
		2	2,08 }	"			
		2	2,14 }	"			
			—2,4 }				
4. 2. 10	13.	2	0,5 Serum	neg.	0,5 Serum löst komplett		0,1 Serum schützt
		8	0,75 } auf 20 g	pos.	0,25—0,15 Serum stark		0,05 Serum verläng. Inkub.-Zeit 1—Tage
			—2,0 }				
		6	1,33 } Blut	pos.	0,1 Serum mäßig	neg.	
			—2,0 }				
18. 2. 10	27.	4	2,0 Serum auf 20 g	pos.	0,5 Serum stark	—	0,1 Serum schützt
		6	0,75—1,5 Ser. auf 20 g	neg.	0,25—0,15 Serum mäßig		0,05 " "
					0,1 Serum wenig		
10. 3. 10	47.	14	0,7—2,0 Ser. auf 20 g	neg.	0,1 Serum fast komplett	—	0,1 Serum schützt
					0,5 Serum mäßig		0,05 " "
					0,25 Serum Spur		0,025 " "

Datum	Tag nach der Injektion	Hämolyse in Mäusen			Hämol. v. Mäuseblut in vitro 1 ccm 5-proz. Blut+0,1 Kompl.	Infektiosität	Trypanozide Kraft im Mischversuch gegen 0,2 Tryp.-Aufschwemmung
		Zahl d. Mäuse	Dosis	Ergebnis			
Ziege IV. 40 kg, 13. 12. 09 injiz. intravenös Blut einer Maus, Stamm „Ferox“.							
21. 12. 09	8.	3	1,0 Blut	neg.		von 3 Mäusen 1 pos. nach 5 Tagen	
5. 1. 10	23.	8	1,43—2,0 Blut auf 20 g	neg.	4. 1. 10, 0,1 Ser. löst komplett	von 8 Mäusen 8 pos. nach 2—3 Tagen	
8. 1. 10	26.	3	1,05—1,78 Blut auf 20 g	neg.	—	von 3 Mäusen 3 pos. nach 2—3 Tagen	
18. 2. 10	67.	3	2,0 Serum auf 20 g	neg.	0,25 Serum Spur	—	0,1 Ser. verläng. Inkub.-Zeit 2 Tage 0,05 Ser. verläng. Inkub.-Zeit 1—2 Tage
0. 3. 10	87.	3	2,0 Serum auf 20 g	neg.	—	—	0,1 Ser. verläng. Inkub.-Zeit 2 Tage 0,05 Ser. verläng. Inkub.-Zeit 1 Tag
Ziege VII. 38 kg, 30. 12. 09 injiz., intravenös, Blut von 4 Mäusen, „Mischstamm“.							
6. 1. 10	7.	8	2,0 Blut auf 20 g	neg.	0,15 Serum löst komplett 0,1 Serum löst fast komplett	von 8 Mäusen 8 pos. nach 2—3 Tagen	
1. 1. 10	9.	3	1,54—1,66 Blut auf 20 g	neg.	—	von 3 Mäusen 3 pos. nach 2—3 Tagen	
2. 10	36.	6	1,43—2,0 Blut auf 20 g	neg.	—	von 6 Mäusen 6 pos. nach 2—3 Tagen	
2. 10	37.	2	2,0 Serum auf 20 g	neg.	0,25 Serum wenig		
2. 10	50.	3	2,0 Serum auf 20 g	neg.			
3. 10	70.	3	2,0 Serum auf 20 g	neg.			

Auch sonst zeigte sich, wie ein Blick auf die Tabelle lehrt, daß die Erscheinung bis zu einem gewissen Grade unabhängig war vom Titre der in vitro wirkenden Hämolsine. Bei relativer Höhe desselben blieb sie aus, während sie bei Ziege VIII trotz niedrigen Titters auch mit kleinen Serumdosen hervorgerufen werden konnte. Im Reagensglas wirkende hämolytische Antikörper waren bei der Ziege V schon zu einer Zeit nachweisbar, wo auch hohe Blutdosen keine Hämoglobinurie in Mäusen erzeugten; sie waren in gleicher Stärke vorhanden am 21. Tage, wo schon 0,5 Serum auf 20 g Maus das Phänomen in Erscheinung treten ließen. Nur insofern schien ein gewisser Parallelismus zwischen hämolytischem Titer und der Fähigkeit, Hämoglobinurie hervorzurufen, doch zu bestehen, als die letztere erloschen war, wenn auch der Titer unter eine bestimmte Höhe gesunken schien. Das kann aber ebensogut ein nur zufälliges Zusammentreffen gewesen sein. Aus dem Gesagten geht wohl hervor, daß, wenn überhaupt, das Phänomen nicht von der An-

wesenheit in vitro wirkender Hämolysine allein abhängig sein kann. Es würde zunächst zu erörtern sein, warum es ausblieb bei den Ziegen, deren Blut sich als infektiös erwies. Es liegt nahe, dies so zu erklären, daß die Trypanosomen bei ihrer Entwicklung im Mäuseorganismus gewisse zum Zustandekommen der Hämolyse in vitro notwendige Stoffe verbrauchten. Wohl keiner der Versuche spricht gegen diese Möglichkeit, auch der Umstand nicht, daß bei den Ziegen III, V und VIII in der ersten Zeit nach Injektion der Ziegen die Erscheinung ausblieb. Offenbar waren zu dieser Zeit die Körper, auf deren Anwesenheit die Hämoglobinurie im Mäuseorganismus zurückzuführen ist, im Ziegenblut noch nicht in genügender Menge vorhanden. Wir kommen damit auf die Frage nach dem Wesen der in vivo hämolysierenden Stoffe. Sind diese mit den in vitro wirkenden Hämolysinen identisch oder sind sie besonderer Art? Soweit sich aus meinen Untersuchungen in dieser Richtung Schlüsse ziehen lassen, scheinen sie mir mehr für die letztere Annahme zu sprechen. Im ersteren Falle bliebe nur die Möglichkeit, anzunehmen, daß die Giftigkeit der in vitro wirksamen Hämolysine durch andere im Ziegenorganismus entstandene Körper — zu denken wäre hier in erster Linie an die gegen die Trypanosomen gerichteten Immunstoffe — so erhöht würde, daß es durch sie auch in vivo zur Hämolyse kommt. Es ist durchaus möglich, daß diese Immunstoffe sich erst später bilden als die Hämolysine, was das spätere Auftreten der Fähigkeit, Hämoglobinurie zu erzeugen, erklären würde. Daß aber die trypanoziden Antikörper tatsächlich diese Rolle spielen, dagegen spricht ein Versuch. Bei der Ziege III konnte am 37. Tage Hämoglobinurie nicht mehr hervorgerufen werden, obgleich zu dieser Zeit der hämolytische Titer in vitro und die trypanozide Fähigkeit nicht geringer waren als bei anderen Ziegen, mit deren Blut und Serum der Versuch positiv ausfiel. Das spricht wohl gegen die Annahme einer Toxizitätserhöhung, wenigstens soweit die trypanoziden Antikörper in Frage kommen. Beweise für die andere Annahme, daß die Erscheinung durch besondere, bisher noch nicht bekannte Stoffe verursacht wird, habe ich allerdings auch nicht beibringen können. Ich möchte mich deswegen auf die vorstehende Erörterung beschränken. Nur auf eins möchte ich noch hinweisen. Sind die Stoffe besonderer Art, so ist wahrscheinlich, daß sie mit den Trypanosomen in direktem Zusammenhang stehen, und es ist daran zu denken, daß sie nicht, wie es anfangs schien, spezifischer Natur sind.

*Nachdruck verboten.*

## Ueber Spiroptera strongylina Rud.

[Aus dem Zoologischen Museum der Universität zu Königsberg i. Pr.]

Von **Joan Clurea**, Stadtierarzt in Piatra Neamtz, Rumänien.

Mit 1 Tafel und 1 Textfigur.

*Spiroptera strongylina*, schon lange als Bewohner des Magens von *Sus scrofa* L. bekannt, wurde zum erstenmal von **Bremser** im Magen des Wildschweines gefunden und von **Rudolphi** (1) in seiner *Entozoorum synopsis* 1819 als n. sp. unter Spiropteren mit nacktem Mund, wie folgt, beschrieben:

reig sein kann.  
 leb bei den Zee-  
 lies so zu erklä-  
 äuseorganismus  
 notwendige  
 egen diese Mä-  
 in III, V und  
 scheinung an-  
 en Anwesenheit  
 ist, im Ziege-  
 kommen dann  
 enden Stoffe  
 atisch oder st-  
 chungen in  
 ehr für die  
 ur die Mög-  
 n Hämolyse  
 - zu denken  
 gerichteten  
 vivo zur Häm-  
 runstoffe  
 auftreten der  
 Daß aber die  
 1. dagegen  
 ge Hämolyse  
 er Zeit der  
 cht geringer  
 er Versuch  
 toxizität  
 ige kommen  
 durch bes-  
 abe ich alle  
 egen auf  
 ite ich neu  
 heinlich  
 hen, an-  
 jen, spez-

„*Bremserus* sex specimina misit in Suis ferae ventriculo reperta, quorum duo mascula circiter lineas, reliqua feminea sex ad septem lineas longa, omnia tenuia, alba.

Caput exiguum, continuum, ore orbiculari. Corpus antrosum potissimum attenuatum. Cauda maris alterius spiram simplicem, alterius spiram unam cum dimidia absolvens, ala utrinque lata, radiata, spiculo longissimo; apice caudae brevissimo nudo (non alato). Caudae femineae apex depressus, rectiusculus, subacutus. Obs. Entozoa obiter inspecta facile pro *Strongylis* haberi possent, sed alae laterales (neque bursa terminalis), apice caudae nudo, *Spiroptera* esse evincunt *Strongyli* etiam crassiores esse solent.“

Bremser (2) hat 1824 in seinen *Icones helminthum* den Wurm abgebildet, ohne der Beschreibung Rudolphis etwas Neues hinzuzufügen.

Gurlt (3) fand in Deutschland *Spiroptera strongylina* im Magen des Hausschweines und erwähnt in seiner *Pathologischen Anatomie* 1831, daß die Vulva vor dem After mündet.

Im Jahre 1847 kommt Gurlt (4) mit einigen Ergänzungen wieder auf seine frühere Beschreibung über *Spiroptera strongylina* zurück:

„Vom Munde an gehen über den ganzen Schlund zwei spiralförmig gewundene Muskelstreifen, einer von links nach rechts, der andere von rechts nach links sich windend, so daß sie sich immer an zwei Seiten durchkreuzen, wodurch das Ganze ein schönes Ansehen erhält. Am Schwanzende des Männchens sind die beiden häutigen Seitenflügel mit vielen querlaufenden, feinen wellenförmigen Muskelfasern durchzogen. Die beiden Ruten von ungleicher Länge sind lang hervorgestreckt.“

Diesing (5) erwähnt 1851 in seinem Werk: *Systema helminthum*, daß Natterer diesen Parasiten in Brasilien aus *Dicotyles albirostris* gesammelt hat. Nach Molin (6) handelt es sich aber bei diesem Fund nicht um *Spiroptera strongylina*, sondern um die erst von Molin unterschiedene ähnliche Art *Spiroptera sexalata*. *Dicotyles albirostris* ist deshalb aus den auch noch von Stossich (12) angeführten Wirten von *Spiroptera strongylina* zu streichen.

Molin (6), der von *Spiroptera strongylina* nur alte, von Bremser im Magen des Wildschweines gefundene Exemplare untersucht zu haben scheint, bemerkte, daß der Körper dieses Schmarotzers quer gestreift ist, die Seitenflügel der Bursa im Hinterteil 3 Rippen haben und die Mündung der Vulva im Hinterteil des Körpers, wie Gurlt erwähnt, liegt.

Dank der Untersuchung zahlreicher Nematoden durch Schneider (7) hat die Kenntnis der *Spiroptera strongylina* einen weiteren Fortschritt gemacht. Dieser Forscher hat besonders die Bursa des Männchens richtig geschildert. In seinem großen Werk: *Monographie der Nematoden*, gibt Schneider folgende Diagnose:

„Mund rund, ohne Lippen, führt in ein Vestibulum, Seitenmembran nur an einer Seite vorhanden. Eier dickschalig, elliptisch. Bursa blattförmig, Ränder derselben stark hervortretend, sehr ungleichseitig ausgebildet. Papillen jederseits 6; 1 und 2 hinter dem After, 3—6 neben und vor dem After ungleich verteilt. Die Geschlechtsöffnung nach hinten von einem Kranz von Zähnen besetzt.“

Wenn auch Schneider in seiner Beschreibung von 6 Papillen spricht, so sind in seiner Zeichnung nur 5 abgebildet (p. 101), von welchen eine hinter dem After liegt, was zutreffend ist.

v. Listow (8) gibt endlich Ergänzungen über den Bau von *Spiroptera strongylina* gelegentlich seiner Revision des Materials aus dem Königl. Naturalienkabinett Stuttgart — von v. Hering in Württemberg gesammelt — wie folgt:

„Die beiden Cirren sind ungleich und messen 0,72 und 0,26 mm, sie sind säbelförmig gebogen und ist der kürzere etwas breiter. Der Mund zeigt 6 große, rundliche



vorgewölbte Papillen. Der Kranz von Zähnen hinter der Geschlechtsöffnung, welchen Schneider abbildet, besteht aus sägeförmigen Hautvorsprüngen, die überall an der Bursa, die kantige Längsleisten hat, entstehen, wo sie zufällig eine Querfalte bildet.“

Auch Fedtshenko (9) traf im Jahre 1886 die *Spiroptera strongylina* im Darm des Hausschweines von Turkestan.

In einer interessanten Arbeit von v. Rátz (10) spricht dieser über die Störungen, welche der in Ungarn sehr oft vorkommende Parasit im Magen des Schweines verursacht.

v. Rátz sagt am Schluß seiner Arbeit:

„Diese Beobachtungen liefern mithin den Beweis, daß *Spiroptera strongylina* bei uns häufiger vorkommt als in anderen Schweinezucht treibenden Ländern. Andererseits aber ergeht aus meinen Beobachtungen, daß dieselbe im Magen des Schweines durchaus kein unschädlicher Gast ist, wie man bisher geglaubt, indem sie in Fällen, wo sie in größeren Anzahl in den Magen wandert, schwere Entzündungen und Geschwürsbildung verursacht, welche natürlicherweise Verdauungsstörungen und selbst den Tod herbeiführen können.“

Bezüglich der Morphologie von *Spiroptera strongylina* möchte ich auch eine Notiz, welche kürzlich erschienen ist, erwähnen.

In einer am 9. Februar 1911 stattgefundenen Sitzung der „Helminthological Society of Washington“ bringt Foster (11) eine kurze Mitteilung über einen im Magen des Hausschweines gefundenen Nematoden, welchen er vorläufig mit *Spiroptera strongylina* identifiziert. Foster behauptet, der von ihm gefundene Schmarotzer unterscheidet sich von *Spiroptera strongylina* dadurch, daß der Mund 2 Lippen mit 6 langen Papillen hat und die Mündung der Vulva im Vorderteil des Körpers liegt. Durch Vergleich seiner Spiropteren mit den im Bureau of Animal Industry aufbewahrten, von Kilborne im Jahre 1884 gesammelten Exemplaren hat Foster sich überzeugt, daß auch bei letzteren die Vulva am Vorderteil mündet. Deshalb wirft er die Frage auf, ob der von ihm gefundene Schmarotzer eine neue Species ist, oder in der Beschreibung der europäischen *Spiroptera strongylina* ein Fehler vorliegt.

Nach meiner unten stehenden Schilderung erweist sich letzteres als richtig.

Im Sommerhalbjahr 1910 habe ich zum erstenmal im Schlachthof zu Piatra Neamtz (Rumänien) *Spiroptera strongylina* im Magen des Schweines gefunden, und zwar waren 9 unter 72 gesunden Schweinen mit diesem Schmarotzer behaftet.

Die Infektion war gering, die Zahl der Parasiten schwankte zwischen 1—27 in einem Magen. Die Weibchen überwogen in der Mehrzahl.

Die Parasiten befanden sich gruppenweise im Magen unter der Schleimhaut und sind durch diese als wellig gewundene Fäden sichtbar. Nach Herausnahme des Magens kommen die Würmer aus der Schleimhaut heraus und bleiben nur mit dem Kopf in derselben eingebohrt.

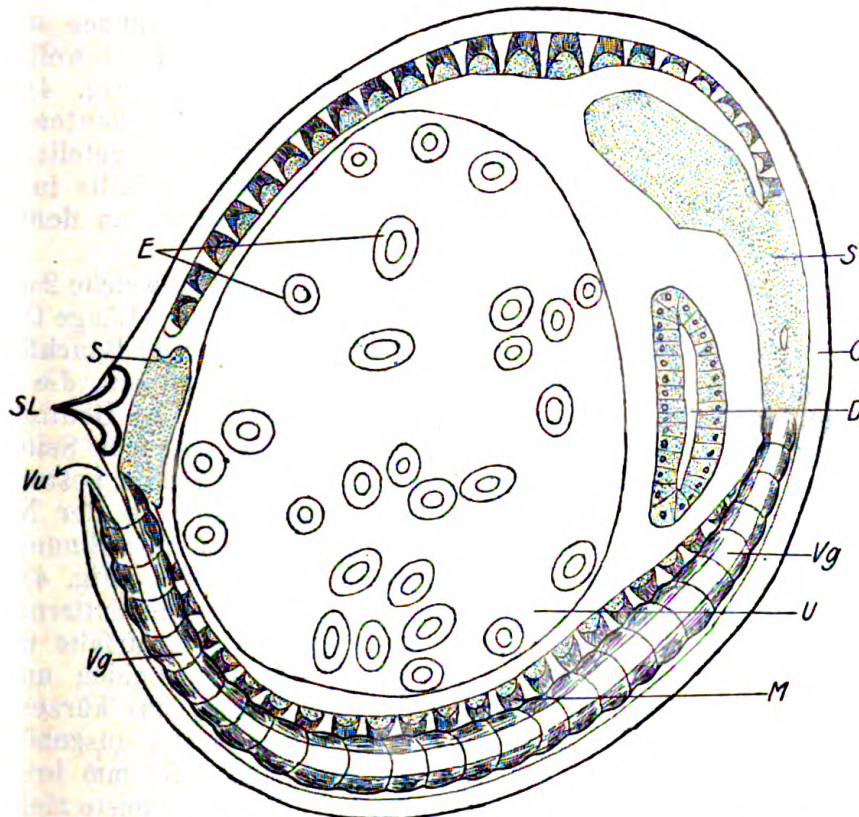
Da in allen von mir beobachteten Fällen die Infektion gering war, konnte ich wesentliche Veränderungen des Magens nicht wahrnehmen.

Die von mir gesammelten und in 5-proz. Formalinlösung konservierten Spiropteren dienten mir als Material zu meinen Untersuchungen, welche ich im Zoologischen Museum zu Königsberg i. Pr. vorgenommen habe.

Diese Forschungen ergaben über die Charaktere der *Spiroptera strongylina* folgendes:

Körper weißlich, fadenförmig, nach vorne etwas verjüngt (Fig. 1). Cuticula sehr resistent, quergestreift und am Vorderkörper dünner,

3,8  $\mu$ , nach hinten stärker werdend bis zu 9,5  $\mu$ . Auf der linken Seite des Körpers befindet sich eine flügelartige Längsleiste, 0,26 mm hinter dem Vorderende des Körpers schwach beginnend, dann stärker werdend und bis auf einige Millimeter vor dem Hinterende sichtbar. Diese Längsleiste ist fein quergestreift. Auf einem Querschnitt durch den Wurm sieht man, daß in der Längsleiste der Cuticula eine im Querschnitt umgekehrt V-förmig, mit Hämatoxylin ähnlich den noch zu erwähnenden Verdickungsleisten in der Intima des Vestibulums sehr intensiv färbbare Substanz eingelagert ist, und daß die entsprechende Seitenlinie stets schwächer als diejenige auf der rechten Seite ausgebildet ist (Textfig. 1).



Textfig. 1. Querschnitt durch *Spiroptera strongylina* ♀ in Höhe der Vulva, etwas schematisiert. Vergr. ca. 50:1, C Cuticula, D Darm, E Eier, M Muskeln, S, Seitenlinien, SL Seitenleiste, U Uterus, Vg Vagina, Vu Vulva.

Der Kopf ist nicht vom Körper abgesetzt, nach vorne abgerundet und trägt auf der Scheitelfläche die sechseckige Mundöffnung mit abgerundeten Ecken und rund vorspringenden Seiten (Fig. 2), so daß diese — von v. Linstow als Papillen beschrieben — nichts anderes sind als die den Mundrand bildenden 6 Lappen. Der Mund führt in ein zylindrisches Vestibulum von 104  $\mu$  Länge und 30  $\mu$  Breite, auf dessen Innenfläche man die spiraligen Windungen einer glänzenden Leiste bemerkt (Fig. 3).

Nur Gurlt hat diesen Stützapparat des Vestibulum erwähnt, glaubte jedoch, daß es 2 spiralförmig gewundene Muskelstreifen sind, von denen einer von links nach rechts und der andere von rechts nach links geht. Um Muskeln handelt es sich nicht, sondern um eine leistenförmige,

9\*



in Spiraltouren verlaufende Verdickung der Intima, doch bin ich nicht darüber sicher geworden, ob es sich nur um eine einzige Leiste handelt oder, wie ich vermute, um drei.

Dem Vestibulum folgt ein trichterförmig beginnender Oesophagus von 3,93 mm Länge; zuerst etwas schmaler, alsdann bis an das Ende etwas breiter werdend, wo er ohne Bulbus in den Darm mündet, der fast die ganze Körperlänge in gestrecktem Verlaufe durchzieht.

Der Nervenring liegt 0,35 mm und der Exkretionsporus 0,48 mm vom Vorderende entfernt.

Die Männchen sind 10—14 mm lang, 0,34 mm breit; die Seitenleiste zieht bis in die Nähe vom Hinterende des Körpers, welches ca. 1,7 mm bauchwärts einmal aufgerollt und nach dem Ende zu schmaler verläuft.

Bei genauer Betrachtung dieses eingerollten Schwanzes sieht man dessen Bauchfläche bis in die Nähe der Bursa von 7—8 wellenförmig nebeneinander verlaufenden Längskanten durchzogen (Fig. 4). Diese von einer Verdickung der Cuticula stammenden Längskanten sind in eine Reihe gleichmäßig voneinander entfernter Zacken eingeteilt. Infolge ihrer Lage bin ich der Ansicht, daß sie eine wichtige Rolle in der Begattungszeit spielen, indem das Männchen sich dadurch an dem Körper des Weibchens festhalten kann.

Hinter diesem Teil des Körpers folgt dann die Bursa, welche 2 ungleiche Seitenflügel hat, von denen der rechte breiter und länger (Länge 0,57 mm), der linke schmaler und kürzer (Länge 0,38 mm) ist. Die Bauchfläche der Bursa ist dicht längsgestreift und mit 20 Papillen versehen, die ich ihrer Lage wegen in Genital- und Sinnespapillen einteile. Die Genitalpapillen sind größer und sitzen, mit einem Stiel versehen, an jeder Seite 5, von welchen 4 vor dem After ungleich verteilt sind, und eine postanal liegt. Die Sinnespapillen sind sehr klein und liegen ganz in der Nähe der Schwanzspitze, jederseits 5. Diese 10 kleinen von mir Sinnespapillen genannten Bildungen sind bisher nicht erwähnt worden (Fig. 4).

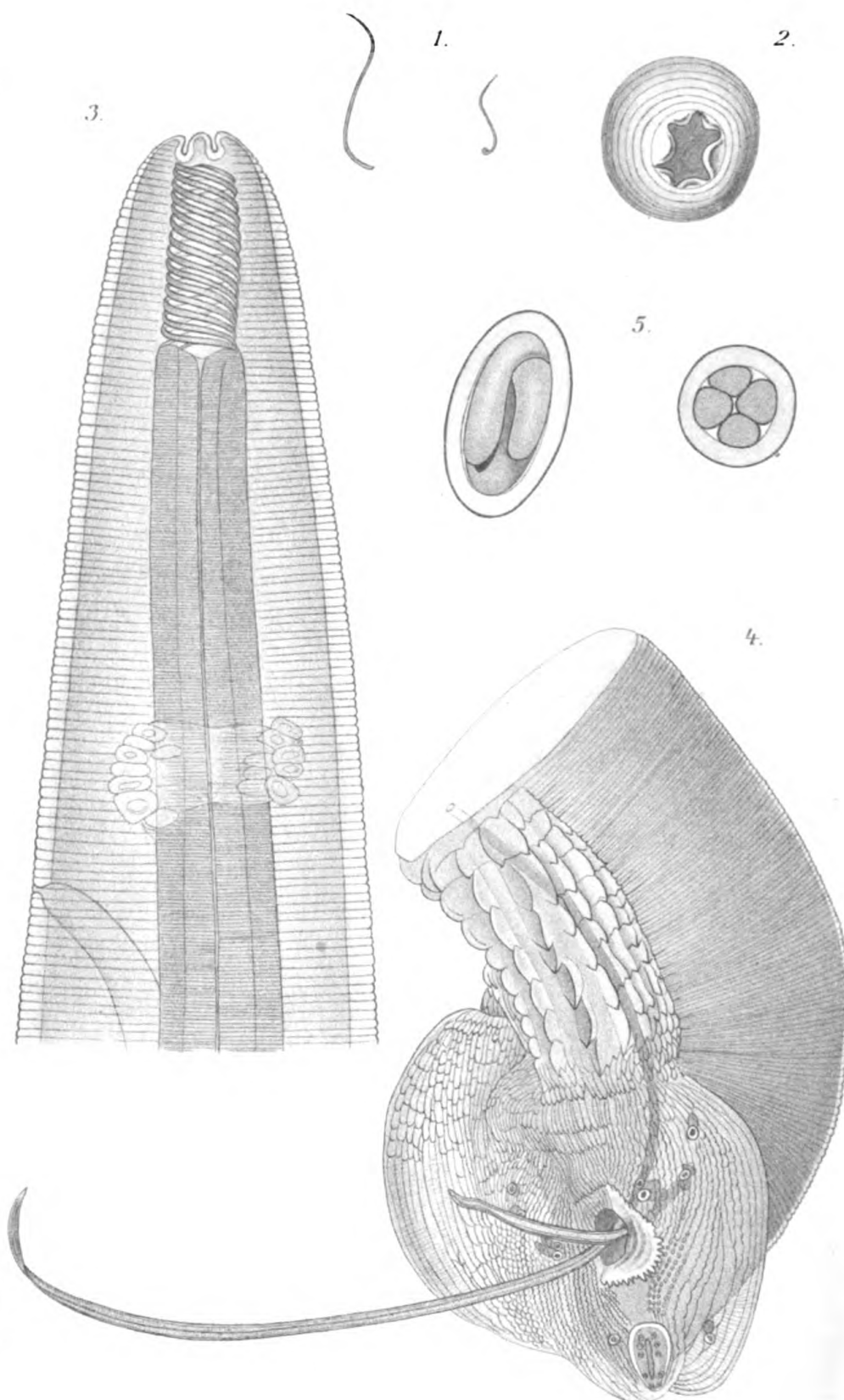
Die Aftermündung liegt 0,19 mm vom Schwanzende entfernt und ist dicht nach hinten von einer halbkreisförmigen Cuticularfalte umgeben, deren freier Rand in Zähnchen ausläuft. Von den beiden ungleichen Spiculis ist das längere 977  $\mu$  lang und 13  $\mu$  breit, das kürzere 221  $\mu$  lang und 17  $\mu$  breit; sie sind bauchwärts rinnenförmig ausgehöhlt.

Die Weibchen sind 17—26 mm lang und 0,54 mm breit. Der Körper ist vor der Mitte etwas eingeschnürt, die Seitenleiste zieht bis ca. 8 mm vor dem Hinterende, welches in eine gerade und konische Spitze ausläuft. Sehr merkwürdig ist es, daß die Mündung der Vulva bei diesem Schmarotzer seitlich, also nicht ventral liegt, was meines Wissens sonst bei Nematoden nicht beobachtet worden ist; von dieser Lage habe ich mich sowohl an Totalpräparaten wie an Schnittserien überzeugt (Textfig. 1).

Die Vulva mündet vor der Mitte, 7—8 mm vom Vorderende entfernt, und zwar bei der erwähnten Einschnürung des Körpers mit einer kleinen elliptischen Oeffnung in der Nähe der Seitenleiste.

Bei vielen Exemplaren habe ich bemerkt, daß über der Vulva ein von eigenartigem Zement zusammengesetztes Klümpchen haftet, welches in Alkohol unlöslich ist, sich aber in verdünnter Kalilauge auflöst. Auf Querschnitten kann man sich überzeugen, daß die Oeffnung der Vagina mit derselben geschichteten Masse verschlossen ist, deren Aufgabe, wie bei Sclerostomiden und Echinorrhynchiden, die innige Verbindung beider Geschlechter während der Begattung ist. Der Pfropf wird von den Analdrüsen des Männchens abgesondert.





An die Vulva schließt sich eine lange, muskulöse Vagina an, welche zuerst in halbkreisförmigem Bogen von links nach rechts den Darm und Uterus umgürtet, hierbei zwischen Hautschicht und Muskulatur verlaufend (vgl. Textfig. 1), und dann in die rechte Seitenlinie eintritt, um dieser eine kurze Strecke zu folgen und nach ihrem Wiederaustritt in den Uterus überzugehen. Letzterer ist mit zahlreichen Eiern angefüllt und nimmt  $\frac{3}{4}$  der Leibeshöhle ein.

Die Eier sind elliptisch, 38  $\mu$  lang und 20  $\mu$  breit und von dicker Schale umgeben; die Embryonalentwicklung wird im Uterus durchlaufen.

Der After mündet 0,27 mm vom Schwanzende entfernt.

#### Literatur.

- 1) Rudolphi, C. A., Entozoorum synopsis. Berol. 1819. p. 23 u. 237.
- 2) Bremser, J. G., Icones helminthum. 1824. Taf. II. Fig. 15—18.
- 3) Gurlt, E. F., Pathol. Anat. 1831. p. 352. Taf. VI. Fig. 11—16.
- 4) — Magazin. f. d. gesamte Tierheilk. 1847. p. 76.
- 5) Diesing, C. M., Systema helminthum. II. Vindob. 1851.
- 6) Molin, R., Wien. Sitz.-Ber. Bd. 38. 1859. p. 924.
- 7) Schneider, A., Monographie der Nematoden. 1866. p. 101.
- 8) v. Linstow, Württemb. naturw. Jahresh. 1879. p. 327. Taf. V. Fig. 11.
- 9) — Arch. f. Naturgesch. Bd. 49. 1883. p. 286.
- 10) v. Rátz, St., Zeitschr. f. Tiermedizin. 1899. p. 324.
- 11) Foster, The Helminthological Society of Washington. (Reprinted from Science. N. S. Vol. 33. No. 850. p. 590—592. 14. April 1911.)
- 12) Stossich, M., Bolletino della Società Adriatica di Scienze Naturali in Trieste. 1898. p. 91.

#### Tafelerklärung.

- Fig. 1—5. *Spiroptera strongylina* Rud.  
Fig. 1. Links Weibchen, rechts Männchen in nat. GröÙe.  
Fig. 2. Scheitelaussicht des Kopfes. Vergr. 390:1.  
Fig. 3. Vorderende bis zum Exkretionsporus. Vergr.  
Fig. 4. Hinterende vom Männchen. Vergr. 128:1.  
Fig. 5. Ei, links von der Fläche, rechts im optischen Querschnitt. Vergr. 700:1.

#### Nachdruck verboten.

## Contribution à la connaissance des modifications de la résistance des animaux vis-à-vis des microorganismes pathogènes. II. Choléra.

[Clinique des maladies professionnelles de Milan.  
(Dirigée par Mr le Prof. L. Devoto.)]

Par le Dr. Carlo Bezzola, chef de laboratoire.

Kulescha<sup>1)</sup> a rapporté, il n'y a pas longtemps, les résultats de ses recherches sur 430 autopsies de cholériques. Il a trouvé 42 fois de la cholécystite, catarrhale ou hémorrhagique, quelquefois exudative. Dans ces cas l'ensemencement de la bile développait presque toujours des vibrions: dans d'autres cas quoique les alterations inflammatoires de la vésicules étaient de très faible intensité, l'ensemencement donnait lieu

1) Klin. Jahrb. Bd. 24.

assez souvent au développement du vibron cholérique (dans une série le 46 % des cas, dans l'autre le 76 %). Ces faits démontrent, dit l'A., que la bile est l'un des refuges préférés du choléra ce qui est d'ailleurs prouvé par le fait qu'il y demeure plus longtemps que dans l'intestin. Cette préférence des voies biliaires, peut conduire à une excrétion chronique des vibrions.

L'influence favorable de la bile sur le développement du vibron du choléra s'accorde aussi avec ce que nous savons sur la localisation du bacille de la fièvre typhoïde, qui lui aussi trouve dans la bile des conditions très favorables d'existence.

Schlesinger<sup>1)</sup> a été le premier, je crois, à étudier, par conseil de Piorkowski, l'influence exercée par la bile sur l'infection typhoïde et par le *B. coli* dans le péritoine du cobaye. Piorkowski avait initié lui même, quelque temps avant, ces recherches mais sans les publier.

Schlesinger observe que l'injection simultanée de bacilles et de bile dans le péritoine du cobaye produit un accroissement considérable de virulence chez les microorganismes. On parvient pourtant au même résultat en injectant d'abord la bile, quelques heures avant, et après les bacilles.

Depuis quelques temps j'étudie l'influence exercée par quelques sécrétions ou extraits d'organes normaux, sur le développement des procès infectifs. Ces recherches ont été déjà en partie publiées. Celles que je vais rapporter, concernent l'influence exercée par la bile sur le cours de l'infection du choléra lorsque la bile et les vibrions sont injectés simultanément dans le péritoine du cobaye. Ces recherches représentent un côté particulier de la question générale que nous avons traité et sur laquelle nous reviendrons d'ici peu avec la publication in extenso.

Deux mots sur le matériel employé et sur la technique que nous avons suivie.

La bile était recueillie de lapins absolument sains, et distribuée dans différents flacons, conservés à —10—15°. Elle se conserve très bien et ne subit aucun changement dans ses propriétés.

Les cepts qu'on a employé sont:

Choléra Pfeiffer avirulent (virulence = 5 anses) pour un cobaye de 200 gr.

Choléra Spinazzola (virulence = 2 anses) pour un cobaye de 200 gr.

Choléra Milano (virulence = 1 anse) pour un cobaye de 200 gr.

Vibrio El Tor (virulence  $\frac{1}{100}$ ) pour un cobaye de 200 gr.

Les sérums immuns indiqués dans les tables suivantes, sont tirés d'un lapin ou d'un cobaye. Leur titre pour 1 anse de V. El Tor et pour les animaux de 200 gr est respectivement de 0,00001 et de 0,01 dans l'expérience de Pfeiffer. Les bacilles suspendus en solution physiologique et la bile, casuellement même le sérum immun, ont été toujours injectés simultanément. La quantité de liquide injecté a été constamment de 1 c. c. excepté dans les expériences de guérison chez lesquelles on injecta à deux reprises 2 c. c. de liquide.

L'injection simultanée des bacilles du choléra Milano (virulence = 1 anse) et de petites doses de bile de lapin, 0,1, c. c. dans le péritoine du cobaye diminue considérablement la dose mortelle minimale des vibrions en rapport aux contrôles.

1) Berl. klin. Wochenschr. 1908.

Table 1.

Numéro de l'animal	Poids gr	Vibrions du choléra Milano anse	Bile de lapin	Solution physiologique	Observations
551	220	$\frac{1}{10}$	0,1 c. c.	jusqu'à 1 c. c.	Après 6 <sup>h</sup> : vibrions nombreux. Meurt < 24 <sup>h</sup>
552	210	$\frac{1}{100}$	0,1 „	idem	idem
553	200	$\frac{1}{1000}$	0,1 „	„	Après 6 <sup>h</sup> : très peu de vibrions; leucocytes assez nombreux Après 24 <sup>h</sup> : pas de vibrions; leucocytes très nombreux. Survit
550	225	1	—	„	Après 16 <sup>h</sup> : pas de vibrions; leucocytes nombreux Meurt < 48 <sup>h</sup>

Le cobaye 550 a été injecté dans le péritoine avec 1 anse de vibrions du choléra M. Après 18 heures le péritoine est délivré des vibrions: il y a des leucocytes en nombre assez considérable et l'animal meurt 48 heures après l'injection. Le cobaye 552 au contraire a été injecté dans la péritoine avec  $\frac{1}{100}$  d'anse (c'est-à-dire avec la 100<sup>ème</sup> partie des vibrions injectés au cobaye 550) et avec 0,1 c. c. de bile de lapin, il meurt en moins de 24 heures présentant une augmentation rapide et progressive des vibrions dans la cavité péritonéale. Le cobaye 553 reçu  $\frac{1}{1000}$  d'anse de vibrions et 0,1 c. c. de bile et survit l'infection mais 18 heures après l'injection il présentait encore des vibrions dans le péritoine.

Ce n'est pas ici le moment de discuter sur les causes qui produisent ce phénomène: j'y reviendrai plus tard. Dès maintenant il faut rappeler que la bile injectée par voie péritonéale à des cobayes de 200—250 gr possède déjà une action toxique. La dose mortelle minime pour des animaux du poids cité ci-dessus est à peu près de 0,3 c. c. La quantité de 0,1 c. c. que j'ai presque toujours employé est bien tolérée par le cobaye, qui, après de légères convulsions suivies par un malaise de quelques heures se reprend complètement.

Donc, même pas la dose 0,2 est une dose mortelle.

Les mêmes résultats évidents qu'on a obtenus avec le cep Milano dans table 1 se rencontrèrent avec le choléra Spinazzola.

Table 2.

Numéro de l'animal	Poids gr	Vibrions du choléra Spinazzola anse	Bile de lapin	Solution physiologique	Observations
756	205	1	0,1 c. c.	jusqu'à 1 c. c.	Après 16 <sup>h</sup> : peu de vibrions; leucocytes nombreux Meurt < 24 <sup>h</sup>
757	225	$\frac{1}{10}$	0,1 „	idem	Après 16 <sup>h</sup> : vibrions très nombreux; peu de leucocytes Meurt < 24 <sup>h</sup>
758	215	$\frac{1}{100}$	0,1 „	„	idem
759	235	$\frac{1}{1000}$	0,1 „	„	Après 16 <sup>h</sup> : pas de vibrions; leucocytes nombreux Survit
435	210	1	—	„	Après 16 <sup>h</sup> : pas de vibrions; leucocytes nombreux Survit

Même dans l'expérience rapportée à la table 2 en ajoutant 0,1 c. c. de bile de lapin, la dose mortelle minime des vibrions se réduit de 2 anses à  $\frac{1}{100}$  d'anse dans le



cobaye 758. A la table 3 on reproduit des résultats plus étonnants encore. Dans ces expériences pourtant on a employé 0,2 c. c. de bile au lieu de 0,1 c. c.

Table 3.

Numéro de l'animal	Poids gr	Vibrions du choléra Spinazzola anse	Bile de lapin	Solution physiologique	Observations
248	205	$\frac{1}{10}$	—	jusqu'à 1 c. c.	Après 6 <sup>h</sup> : peu de vibrions Après 18 <sup>h</sup> : pas de vibrions; leucocytes assez nombreux Survit
242		1	—	idem	idem
344		2	—	„	Après 6 <sup>h</sup> : vibrions très nombreux; peu de leucocytes Meurt < 24 <sup>h</sup>
246		$\frac{1}{100}$	0,2 c. c.	„	Après 6 <sup>h</sup> : vibrions très nombreux; très peu de leucocytes Meurt < 18 <sup>h</sup>
245		$\frac{1}{1000}$	0,2 „	„	idem
244		$\frac{1}{10000}$	0,2 „	„	„
347		—	0,2 „	„	Survit

En suivant l'ordre d'expérience rapporté à la table 3, c'est-à-dire, en ajoutant au vibrions 0,2 de bile on obtient rapidement la mort du cobaye 244 avec  $\frac{1}{10000}$  d'anse c'est-à-dire avec la 20 000<sup>ème</sup> partie de la quantité minime des vibrions nécessaires à tuer le cobaye 344 pour lequel on ne s'est pas servie la bile. Et la mort, est accompagnée dans les deux cas d'une augmentation colossale et rapide des vibrions.

Les résultats rapportés dans les trois premières tables deviennent plus intéressants encore lorsque on les compare à ceux de la table 4 et de la table 5 ou l'on a rapporté les expériences faites avec le vibron El Tor (virulence  $\frac{1}{100}$  d'anse) et avec le choléra Pfeiffer avirulent (virulence = 5 anses).

Table 4.

Numéro de l'animal	Poids gr	Vibrions El Tor anse	Bile de lapin	Solution physiologique	Observations
634	205	$\frac{1}{100}$	—	jusqu'à 1 c. c.	Après 16 <sup>h</sup> : vibrions très nombreux; peu de leucocytes Meurt en 24 <sup>h</sup>
784	210	$\frac{1}{500}$	—	„	Après 16 <sup>h</sup> : pas de vibrions; leucocytes assez nombreux Survit
800	210	$\frac{1}{1000}$	0,1 c. c.	„	Après 16 <sup>h</sup> : vibrions très nombreux; peu de leucocytes Meurt < 24 <sup>h</sup>
801	205	$\frac{1}{10000}$	0,1 „	„	Après 16 <sup>h</sup> : pas de vibrions; leucocytes assez nombreux Survit

A la table 4 on voit en effet que la bile modifie peu la dose mortelle minime des vibrions El Tor qui de  $\frac{1}{100}$  d'anse descend seulement à  $\frac{1}{1000}$  d'anse. Dans le cas du choléra Pfeiffer, cep avirulent, l'action de la bile est moins évidente encore, presque nulle (voir table 5).

Table 5.

Numero de l'animal	Poids gr	Vibrions du choléra Pf. avir. anse	Bile de lapin	Solution physiologique	Observations
730		5	—	jusqu'à 1 c.c.	Après 6 <sup>h</sup> : vibrions nombreux; peu de leucocytes Meurt < 24 <sup>h</sup>
427	210	1	—	idem	Après 6 <sup>h</sup> : pas de vibrions; peu de leucocytes Survit
422	225	1	0,1 c. c.	„	idem
423	210	$\frac{1}{10}$	0,1 „	„	„
594	230	1	0,2 „	„	„
424	200	$\frac{1}{10}$	0,2 „	„	„
426	200	—	0,2 „	„	Survit

Dans l'expérience rapportée (table 5) quoique la technique soit la même, quoique l'on ait employé la même quantité de bile, il n'a pas été possible de baisser la dose mortelle minime des vibrions, d'obtenir, en d'autres termes, une augmentation de la puissance infective des germes ou une diminution dans la résistance de l'organisme du cobaye.

Ces faits ont l'air d'un paradoxe et nous ont fait soupçonner d'abord un défaut de technique, mais ayant répété plusieurs fois les mêmes expériences, nous sommes toujours arrivés aux mêmes résultats.

Avant de passer à l'interprétation de ces faits, il faut se rendre compte exactement de la manière d'agir du système des vibrions et de la bile vis-à-vis des animaux soumis pour quelques temps à des injections interpéritonales de bouillon, et de la façon de réagir des animaux activement ou passivement immunisés.

Table 6.

Numéro de l'animal	Poids gr	24 heures avant l'animal est injecté avec 3 c. c. de bouillon dans le péritoine	Vibrions du choléra Spinazzola anse	Vibrions El Tor anse	Bile de lapin	Solution physiologique	Observations
682	215	idem	$\frac{1}{10}$	—	0,1 c. c.	jusqu'à 1 c.c.	Après 4 <sup>h</sup> : vibrions et leucocytes assez nombreux Après 16 <sup>h</sup> : pas de vibrions; leucocytes nombreux Survit
683	215	„	$\frac{1}{100}$	—	0,1 „	idem	idem
684	215	„	—	$\frac{1}{500}$	0,1 „	„	Après 4 <sup>h</sup> : pas de vibrions; leucocytes assez nombr. Après 16 <sup>h</sup> : leucocytes très nombreux Survit
685	220	„	—	$\frac{1}{1000}$	0,1 „	„	idem
686	200	—	—	$\frac{1}{1000}$	0,1 „	„	Après 16 <sup>h</sup> : vibrions très nombreux; peu de leucocytes Meurt < 24 <sup>h</sup>
758	215	—	$\frac{1}{100}$	—	0,1 „	„	idem

Tandis que 0,1 c. c. de bile réduit la dose mortelle minime du choléra Spinazzo de 2 anses à  $\frac{1}{100}$  au moins d'anse, la même quantité de la même bile demeure sans effet même en employant une plus grande quantité de vibrions ( $\frac{1}{10}$  d'anse) quand l'injection est précédée de 24 heures par une injection de 2 c. c. de bouillon.

Pfeiffer et Bessau ont démontré récemment qu'une injection de quelque c. c. de bouillon dans le péritoine du cobaye rend l'animal très résistante à l'endotoxine du bacille d'Eberth, de sorte qu'il peut en tolérer des doses sans doute mortelles pour les animaux qui n'ont pas eu ce traitement. Cette observation s'accorde avec une observation précédente de Pfeiffer. Il a vu en effet que les cobayes auxquels on a fait en prévention des injections de bouillon dans le péritoine, tolèrent des doses sans doute mortelles de microorganismes introduits interpéritoinement. A la suite de l'inflammation du péritoine, on y constate une augmentation de complément, ou bien il s'y amasse plus considérablement, il est donc permis de penser, comme Pfeiffer et Bessau supposent, que la plus grande résistance des animaux soit en rapport à cette circonstance.

L'expérience rapportée à la table 6 prouve une fois de plus l'exactitude de l'opinion de Pfeiffer et Bessau. L'inflammation, selon ces auteurs, loin d'être nuisible à l'organisme, aide celui-ci fortement à la défense contre les microorganismes, en favorisant leur mort et en modifiant les toxiques produits par leur destruction.

Pas même les animaux immunisés activement ne sont sensibles à l'action de la bile sur les vibrions du choléra.

Les cobayes 697 et 693 immunisés activement au moyen d'injections sous-cutanées de vibrions tués à 60°, tolèrent très bien 1 anse de choléra Spinazzola avec 0,1 c. c. de bile, quantité de vibrions qui vis-à-vis de la même quantité de bile, constitue pour le cobaye normal une dose 200 fois mortelle.

Les cobayes immunisés activement se comportent de la même façon que ceux dont l'immunisation a été passive.

Table 7.

Numéro de l'animal	Poids gr	Vibrions du choléra Spinazzola anse	Bile de lapin	Sérum immun de lapin	Solution physiologique	Observations
796	200	2	—	0,000001 c. c.	jusqu'à 1 c. c.	Après 60': vibrions et grains assez nombreux; peu de leucocytes Meurt < 18 <sup>b</sup>
799	220	2	—	0,00001 „	idem	Après 60': très peu de vibrions; grains nombreux; leucocytes assez nombreux. Survit
798	210	2	0,1 c. c.	0,000001 „	„	Après 60': vibrions et grains assez nombreux; très peu de leucocytes Meurt < 36 <sup>b</sup>
797	200	2	0,1 „	0,00001 „	„	Après 60': pas de vibrions grain assez nombreux. Survit

Dans ce cas aussi, comme il résulte de l'expérience relatée, l'action de la bile est nulle.

La même petite quantité de sérum détruit complètement les vibrions injectés dans le péritoine, avec le tableau classique de la transformation en grains, tant en présence de la bile que quand celle-ci n'y est pas.

On obtient des résultats analogues, ce qui du reste pouvait se prévoir à priori, en substituant au choléra Spinazzola le vibron El Tor comme il est arrivé dans l'expérience rapportée à la table 8.

Table 8.

Numéro de l'animal	Poids gr	Vibrions El Tor anse	Bile de lapin	Sérum immun de lapin	Solution physiologique	Observations
635	205	1	—	0,00001 c. c.	jusqu'à 1 c. c.	Après 60': vibrions et grain assez nombreux Meurt < 16 <sup>h</sup>
632	220	1	—	0,0001 „	idem	Après 60': pas de vibrions; peu de grains et de leucocytes Meurt < 16 <sup>h</sup> (pas de vibrions)
659	200	1	0,1 c. c.	0,00001 „	„	Après 60': vibrions assez nombreux peu de grains et de leucocytes Meurt < 16 <sup>h</sup>
636	225	1	0,1 „	0,0001 „	„	Après 60': pas de vibrions; peu de grains et de leucocytes Meurt < 16 <sup>h</sup> (pas de vibrions)

Il ressort de cette expérience que le sérum immun de lapin peut détruire complètement les vibrions El Tor quoique il n'est pas capable dans la quantité employée de protéger l'animal contre les endotoxines mises en liberté par la bactériolyse.

En effet, les cobayes 632 et 636 sont morts par intoxication en moins que 24 heures, malgré la bactériolyse complète. Le sérum immun de cobaye se comporte de la même façon, pour ce qui se rapporte à la bile de lapin, que le sérum immun de lapin.

Table 9.

Numéro de l'animal	Poids gr	Vibrions El Tor anse	Bile de lapin	Sérum immun de cobaye	Solution physiologique	Observations
785	220	1	—	0,001 c. c.	jusqu'à 2 c. c.	Après 60': vibrions nombreux; peu de leucocytes Meurt en 6 <sup>h</sup>
790	215	1	—	0,01 „	idem	Après 60': pas de vibrions, peu de leucocytes Survit
788	230	1	0,1 c. c.	0,001 „	„	Après 60': vibrions nombreux; peu de leucocytes Meurt < 16 <sup>h</sup>
794	200	1	0,1 „	0,01 „	„	Après 60': pas de vibrions; leucocytes assez nombreux Survit
795	200	1	0,1 „	0,1 „	„	Après 60': pas de vibrions, peu de leucocytes Meurt < 16 <sup>h</sup>

Dans l'expérience relatée dans la table 9, la même quantité minime de sérum de cobaye donne lieu à la bactériolyse complète, en présence ou non de bile.

Dans cette expérience, sauf pour le No. 795, le sérum immun de cobaye semble en plus protéger les animaux contre l'intoxication suivante à la bactériolyse.

Les expériences reproduites aux tables 6, 7, 8, 9 prouvent que le mécanisme d'action de la bile est profondément différent selon qu'il s'agit d'animaux normaux ou de cobayes traités avec le bouillon ou rendus activement ou passivement immuns.

Dans les trois derniers cas l'action de la bile, pour ce qui se rapporte à son action favorable sur le développement de l'infection, est nulle. Ce fait est très important et nous allons tâcher de l'analyser.

J'ai examiné les vibrions soit ou non colorés, avant et après un contact plus ou moins long avec la bile et je peux dire qu'il en résulte aucune modification morphologique digne d'être considérée.

L'expérience reproduite à la table 10 prouve qu'après ce traitement leur virulence même est invariable.

Table 10.

On fait une suspension de deux anses de choléra Spinazzola dans un mélange de 1 c.c. de bile de lapin et de 5 c.c. de solution physiologique. On laisse le tout pendant une demie heure à la température de la chambre, après centrifugation, on décante le liquide, on ajoute aux vibrions qui sont tombés au fond de la solution physiologique et on les injecte avec les modalités ci-dessous:

Numéro	Poids gr	Vibrions du choléra Spinazzola anse	Vibrions Spinazzola traités anse	Bile de lapin	Solution physio- logique	Observations
435	210	1	—	—	jusqu'à 1 c. c.	Après 5 <sup>h</sup> : vibrions nombreux Après 18 <sup>h</sup> : pas de vibrions Survit
436	215	$\frac{1}{100}$	—	0,2 c. c.	idem	Après 5 <sup>h</sup> : vibrions très nom- breux Après 18 <sup>h</sup> : vibrions très nom- breux Meurt en 24 <sup>h</sup>
439	215	$\frac{1}{1000}$	—	0,2 „	„	Après 18 <sup>h</sup> : vibrions nombreux; peu de leucocytes Meurt en 3 <sup>me</sup> journée
440	215	$\frac{1}{10000}$	—	0,2 „	„	Après 18 <sup>h</sup> : pas de vibrions, leucocytes assez nombreux Survit
441	205	—	$\frac{1}{10}$	—	„	Après 5 <sup>h</sup> : vibrions nombreux; peu de leucocytes Après 18 <sup>h</sup> : pas de vibrions Survit
442	210	—	$\frac{1}{100}$	—	„	Après 18 <sup>h</sup> : vibrions assez nombreux; peu de leuco- cytes Après 48 <sup>h</sup> : pas de vibrions, nombreux leucocytes Survit
443	210	—	—	0,2 c. c.	„	Survit

On laisse des vibrions du choléra Spinazzola en contact avec un mélange de bile de lapin et solution physiologique pendant 30 minutes à la température de la chambre. Puis on centrifuge, on décante avec soin, on reprend les vibrions dans une quantité donnée de solution physiologique, et on les injecte aux cobayes dans la mesure indiquée tour à tour dans la table. Les vibrions qui ont subi ce traitement ne montrent aucun changement de virulence vis-à-vis des microorganismes suspendus dans la seule solution physiologique et soumis au même traitement.

Ce fait montre qu'il n'est pas possible que l'action exercée par la bile dans l'infection avec le cep Spinazzola, soit due à une augmentation de virulence des vibrions; et que Schlesinger n'avait pas raison lorsqu'il voulait expliquer par une augmentation de virulence, l'action de la bile de porc dans les infections provoquées par le B. d'Eberth et le B. coli.

Si l'on réunit tous les faits observés sur l'action de la bile dans les animaux, on pourrait penser que dans mes expériences la bile n'a pas le pouvoir d'augmenter la résistance des bacilles parce que ceux-ci fixeraient tout de suite les ambocepteurs bactériolytiques du sérum immun et seraient détruits à l'aide du complément avant que la bile puisse exercer son action.

Contre ce point de vue il y a déjà l'expérience précédente où les vibrions et la bile demeurèrent longtemps, à contact sans qu'on s'aperçut d'aucune augmentation de virulence; de plus voici une autre expérience.

Table 11.

Numéro de l'animal	Poids gr	Vibrions El Tor	Bile de lapin	Solution physiologique	sérum immunitaire de lapin (sol. physiol. jusqu'à 1 c. c.)	Observations
		injections dans le péritoine. Quelque temps après on fait une nouvelle injection des sérum immunitaire comme il vient d'être indiqué à coté				
678	200	1 anse	0,1 c. c.	jusqu'à 1 c. c.	après 8' 0,0001 sér. im.	Après 60': pas de vibrions Meurt < 16 <sup>h</sup> (pas de vibrions)
653	215	idem	0,1 „	idem	après 8' 0,001 sér. im.	idem
654	215	„	0,1 „	„	après 15' 0,05 sér. im.	„
677	205	„	—	„	après 8' 0,0001 sér. im.	„
655	210	„	—	„	après 8' 0,001 sér. im.	„
656	200	„	—	„	après 15' 0,05 sér. im.	„

Les expériences de guérison (table 11) ne prouvent aucune différence de qualité ni de quantité parmi les animaux injectés de vibrions et de bile et ceux qui furent injectés seulement avec les vibrions ce qui prouve que même in vivo la fixation des ambocepteurs aux bacilles n'est aucunement dérangée par la bile; tout à la fait comme j'ai eu occasion de vérifier in vitro.

Il résulte des expériences relatées, comme du reste aussi dans celles de la table 8, que quoique les vibrions ont été totalement détruits par le sérum immunitaire, les cobayes ont succombés par l'endotoxine mise en liberté par la destruction rapide des vibrions.

Ce fait s'accorde d'ailleurs avec ce que nous avons depuis longtemps sur les propriétés du vibron El Tor.

La bile n'empêche donc pas la bactériolyse en présence du sérum immunitaire; mais, elle la neutralise considérablement dans le péritoine des cobayes normaux.

L'action de la bile, telle que je l'ai exposée ne présente aucune analogie ni avec les aggrégines de Bail ni avec les substances antagonistes, découvertes par Pfeiffer et Friedberger.

On ne peut pas l'identifier avec les aggrégines parce que, même des injections répétées de bile, chez le cobaye, ne produisent pas des anticorps spécifiques qui puissent en neutraliser l'action, tandis que l'on sait, comme Bail et ses collaborateurs ont vu, que l'injection de aggrégine chez les animaux produit des anti-aggrégines spécifiques. On ne peut pas même parler d'action antagoniste dans le sens de Pfeiffer et Friedberger. En effet les substances antagonistes paralysent dans le péritoine du cobaye non seulement l'action des bactériolysines normales, mais même l'action des bactériolysines spécifiques tandis que la bile n'exerce aucune action contraire sur la bactériolyse de



sérum immun. Le mécanisme d'action de la bile est en effet profondément différent selon qu'il s'agit de bactériolysines normales ou obtenues par un procès d'immunisation et constitue à mon avis un fait très important.

En outre il s'accorde, toujours dans le champ des études sur le choléra, avec une autre circonstance bien connue. Le vibrion El Tor, dont je me suis moi même servi pour quelques expériences, après quelque passage à travers le cobaye, acquiert une virulence considérable ( $\frac{1}{500}$  d'anse). Eh bien, la même quantité minime de sérum immun de lapin (0,0001) qui peut protéger l'animal dans l'expérience de Pfeiffer contre une anse de vibrions peu virulents (par ex. le choléra Milano dont la virulence est d'une anse) produit aussi une bactériolyse complète quand au lieu d'une anse de choléra Milano, une dose mortelle, dans le péritoine de l'animal, on injecte une anse de vibrions El Tor, c'est-à-dire 500 doses mortelles.

Le mécanisme d'action des bactériolysines normales et spécifiques, dans le cas de mes expériences avec la bile et dans celles que j'ai rapportées avec le vibrion El Tor, s'il ne prouve pas, d'une façon absolue, peut au moins faire penser, avec toute vraisemblance, à une différence entre les bactériolysines normales et celles obtenues par immunisation.

De nouvelles recherches vont décider sur la valeur de cette hypothèse.

#### Conclusions.

1° L'injection simultanée de bile de lapin et de vibrions du choléra dans le péritoine du cobaye diminue considérablement la dose mortelle minime des vibrions.

2° Cette action est due à une paralysie des bactériolysines normales, exercée par la bile et pas à une augmentation de la virulence des vibrions.

3° L'action des bactériolysines obtenues par un procès d'immunisation n'est pas influencée par la bile.

4° L'action de la bile est tout à fait différente de celle des aggrèsines de Bail et des substances antagonistes de Pfeiffer et Friedberger.

*Nachdruck verboten.*

### Einflüsse der verschiedenen Toxine (Tuberkulin und Tetanustoxin) auf die Lipolyse durch Organe.

[Medizinische Klinik der Königl. Universität in Genua  
(Vorstand: Prof. E. Maragliano).]

Von Dr. G. Pesel, Assistenten.

Als Ergänzung zu meinen früheren Forschungen über den Einfluß, welchen Tuberkulin und Tetanustoxin auf den autolytischen Prozeß (1) ausüben, habe ich eine neue Reihe von Untersuchungen vorgenommen, um zu sehen, ob diese Toxine eine Veränderung der lipolytischen Tätigkeit hervorrufen, die, wie bekannt, den verschiedenen Organen der Tiere eigen ist.

Schon Prof. Barlocco, der zu dieser Reihe von Untersuchungen geraten und sie geleitet hat, wies die Wirkung des Diphtherietoxins als positiver Katalysator in der Lipolyse durch Organe nach, denn dieses beschleunigt den Lösungsprozeß in jenen Fällen, in denen das Organ die lipolytische Tätigkeit bereits besitzt, und bedingt ihn dort, wo letzteres nicht der Fall ist (2).

Aus den Resultaten der Untersuchungen, die ich in der Folge mitteilen werde, kann man ersehen, daß sowohl das Tuberkulin, wie auch das Tetanustoxin an und für sich lipolytisch sind. Dieser Befund des Tetanustoxins wie auch der anderen Toxine war übrigens schon von Neuberg (3), Neuberg und Rosenberg (4) und Neuberg und Reicher (5) nachgewiesen. Carrière (6) andererseits hat sogar die lipolytische Tätigkeit in den alten Tuberkelbacillenkulturen nachgewiesen. Prof. Barlocco machte denselben Befund für das Diphtherietoxin (2).

Ein von letzterem in derselben Arbeit angedeuteter Befund ist die verschiedengradige lipolytische Tätigkeit, welche die verschiedenen Organe ein und desselben Tieres sowie die homologen Organe von Tieren verschiedener Gattungen aufweisen. Ich will noch hinzufügen, daß diese Tätigkeit im gleichartigen Organe einzelner Tiere derselben Gattung bedeutend variiert. Ich hatte Gelegenheit, dies festzustellen, indem ich bei meinen Versuchen stets *Mus musculus*-Leber gebrauchte.

Nachdem ich dies nebenbei erwähnt habe, will ich die Methoden anführen, die ich bei meinen Untersuchungen anwendete.

Als Probesubstanz bediente ich mich des Merckschen Butyrins, des Oeles, neutral zu Lackmus, schwach sauer zu Phenolphthalein, emulgiert mit kleinen Mengen von  $N/_{10}$  Sodahydratlösung, des Merckschen Lecithins, Lecithin Agfa.

Das wässrige Tuberkulin stammte aus dem Institute Maragliano für Infektionskrankheiten und das Kochsche Tuberkulin sowie das Tetanustoxin aus dem Serotherapeutischen Institute in Mailand.

\* \* \*

Versuche mit Merckschem Butyrin, neutral zu Lackmus und schwach sauer zu Phenolphthalein.

Zu 99 ccm destillierten und sterilisierten Wassers fügt man 1 ccm Butyrin hinzu und schüttelt diese Mischung so lange, bis sie sich homogen aufschwemmt.

Es werden 5 ccm dieser Aufschwemmung in mehrere Reagensröhrchen eingeführt. Sodann bereitet man steril einen feinen, gleichartigen Leberbrei von einem frisch getöteten *Mus musculus* (die Leber muß vorher mit einer physiologisch sterilen Lösung gewaschen werden).

Sobald die verschiedenen Mischungen laut Angaben nachfolgender Tabellen fertiggestellt sind, werden sie für  $\frac{1}{2}$  Stunde in den Brutschrank bei  $37^{\circ}$  gestellt, und es wird sodann die Titrierung mit einer  $\frac{1}{500}$ -Natriumkarbonatlösung bis zur vollkommenen Neutralisierung der Säure vorgenommen (Phenolphthalein als Indikator).

Jeder Versuch wird in zwei Exemplaren titriert, um einen eventuellen Fehler zu vermeiden.

Aus den angegebenen Daten geht hervor, daß sowohl das Tetanustoxin wie auch das Tuberkulin (sei es Kochsches Tuberkulin oder wässriges Maragliano-Tuberkulin) eine hervorragende Tätigkeit auf den lipolytischen Prozeß durch Organe ausübt.

Tabelle 1.

## Butyrin + Tetanustoxin.

1) 5 ccm Butyrin 1 Proz.	wurde neutralisiert	{ 0,15 ccm } { 0,15 „ }	<sup>1</sup> / <sub>500</sub> Natrium- karbonatlösung
2) 5 „ „	+ 0,05 ccm Tetanustoxin wurde neutralisiert	{ 0,3 „ } { 0,3 „ }	ddl.
3) 5 „ „	+ 0,1 ccm Tetanustoxin wurde neutralisiert	{ 0,5 „ } { 0,5 „ }	„
4) 5 „ „	+ 1 Oese Leber wurde neutrali- siert	{ 7,2 „ } { 7,1 „ }	„
5) 5 „ „	+ 1 Oese Leberverdünnung <sup>1</sup> / <sub>10</sub> wurde neutralisiert	{ 0,8 „ } { 0,8 „ }	„
6) 5 „ „	+ 1 Oese Leber + 0,05 ccm Te- tanustoxin wurde neutralisiert	{ 10,2 „ } { 10 „ }	„
7) 5 „ „	+ 1 Oese Leber + 0,1 ccm Te- tanustoxin wurde neutralisiert	{ 9,8 „ } { 10,5 „ }	„
8) 5 „ „	+ 1 Oese Leber + 0,001 ccm Te- tanustoxin wurde neutralisiert	{ 7,4 „ } { 7,1 „ }	„
9) 5 „ „	+ 1 Oese Leberverdünnung <sup>1</sup> / <sub>10</sub> + 0,05 Tetanustoxin wurde neutralisiert	{ 1,4 „ } { 1,9 „ }	„

Tabelle 2.

## Butyrin + Kochsches Tuberkulin.

1) 5 ccm Butyrin 1 Proz.		{ 0,15 0,15 }
2) 5 „ „	+ 0,25 Tub.	{ 2,4 2,4 }
3) 5 „ „	+ 0,5 „	{ 6,1 6,1 }
4) 5 „ „	+ 1 Oese Leber	{ 5,2 5,1 }
5) 5 „ „	+ 2 Tropfen Leberverdünnung <sup>1</sup> / <sub>10</sub>	{ 0,9 1 }
6) 5 „ „	+ 1 Oese Leber + 0,25 Tub.	{ 8,9 9 }
7) 5 „ „	+ 1 „ „ + 0,5 „	{ 13,5 12,9 }
8) 5 „ „	+ 1 „ „ + 0,01 „	{ 4,2 3,7 }
9) 5 „ „	+ 2 Tropfen Leberverdünnung <sup>1</sup> / <sub>10</sub> + 0,25 Tub.	{ 5,1 5,2 }

Tabelle 3.

## Butyrin + wässriges Maragliano-Tuberkulin.

1) 5 ccm Butyrin 1 Proz.		{ 0,10 0,10 }
2) 5 „ „	+ 0,25 Tub.	{ 3,5 3,5 }
3) 5 „ „	+ 0,5 „	{ 6,8 6,7 }
4) 5 „ „	+ 1 Oese Leber	{ 1,9 1,5 }
5) 5 „ „	+ 2 Tropfen Leberverdünnung <sup>1</sup> / <sub>10</sub>	{ 1,2 1,4 }
6) 5 „ „	+ 1 Oese Leber + 0,25 Tub.	{ 6,3 6,3 }
7) 5 „ „	+ 1 „ „ + 0,5 „	{ 10,8 11,2 }
8) 5 „ „	+ 1 „ „ + 0,01 „	{ 3,7 3,7 }
9) 5 „ „	+ 2 Tropfen Leberverdünnung <sup>1</sup> / <sub>10</sub> + 0,25 Tub.	{ 5,5 5,5 }

Diese Tätigkeit ist ebenfalls in den Versuchen, die mit geringen, an und für sich wenig aktiven Organquantitäten gemacht wurden, stark evident. In den Versuchen mit geringen konstanten Organmengen wurde die Toxinmenge stark vermindert; es zeigte sich in diesen keine evidente Tätigkeit auf Tetanustoxin und Kochsches Tuberkulin, jedoch nahm man sie noch mit Tuberkulin Maragliano in stärkerer Verdünnung wahr.

Versuche mit Oel, neutral zu Lackmus, schwach sauer zu Phenolphthalein, emulgiert mit  $N/_{10}$  Sodahydrat.

\* \* \*

Das Oel, welches zu den Versuchen nach dem Verfahren von Prof. Barlocco verwendet wurde, wurde zuerst mit kleinen Mengen von  $N/_{10}$ -Sodahydrat emulgiert, um den Kontakt mit dem Toxin und den Organen zu begünstigen, da ohne dieses Verfahren dies schwerlich der Fall gewesen wäre, denn die verschiedenen Substanzen hätten sich in mehrere Schichten geteilt.

Die Menge der  $N/_{10}$ -Sodalösung war eine solche, welche die Säure des Oeles, evident zu Phenolphthalein, nicht vollkommen neutralisierte. In unserem speziellen Falle war das Verhältnis  $1/4$  des Oelvolumens.

Fertiggestellt, wurden die diversen Mischungen in verschiedenartigen Versuchen im Brutschrank 16—70 Stunden gelassen.

Die Titrierungen geschahen mit  $N/_{10}$ -Sodahydratlösung bis zur kompletten Neutralisierung der Säure.

Ich will hier vorerst die einzelnen Säuretitrierungen der verschiedenen Toxine, die benutzt wurden, in  $N/_{10}$ -Sodahydratlösung Kubikzentimetern wiedergeben.

5 ccm Kochsches Tub.	= 0,3 ccm Sodahydrat bis zur kompletten Neutralisierung
5 „ Maragliano-Tub.	= 0,7 „ „ „ „ „
5 „ Tetanustoxin	= 0,2 „ „ „ „ „

Tabelle 4.

Emulgiertes Oel + Kochsches Tuberkulin, Tuberkulin Maragliano, Tetanustoxin.  
Titrierung nach 18-stündigem Verbleiben im Brutschrank.

1) 2 ccm emulgiertes Oel		{ 0,7 ccm } $N/_{10}$ NaHO-Lösung
		{ 0,7 „ }
2) dgl. + Koch-Tub. 0,5 ccm		{ 1,3 „ } dgl.
		{ 1,5 „ }
3) „ + M.-Tub. 0,5 ccm		{ 3 „ }
		{ 3,1 „ }
4) „ + Tetanustoxin 0,5 ccm		{ 1,1 „ }
		{ 1,1 „ }
5) „ + 1 Oese Mauseleber		{ 0,9 „ }
		{ 0,7 „ }
6) „ + 1 „ „ + Koch-Tub. 0,5 ccm		{ 1,6 „ }
		{ 1,6 „ }
7) „ + 1 „ „ + M.-Tub. 0,5 ccm		{ 3,2 „ }
		{ 3,2 „ }
8) „ + Tetanustoxin 0,5 ccm + 1 Oese Leber		{ 1,3 „ }
		{ 1,3 „ }
9) „ + Koch-Tub. 0,1 ccm + 1 Oese Leber		{ 1,2 „ }
		{ 1,2 „ }
10) „ + Tetanustoxin 0,1 ccm + 1 Oese Leber		{ 0,9 „ }
		{ 0,9 „ }

Tabelle 5.

Gleich der vorhergehenden. Die Titrierung geschieht nach 40-stündigem Verbleiben im Brutschrank.

1)	2 ccm emulgiertes Oel				$\left\{ \begin{array}{l} 0,7 \text{ ccm} \\ 0,7 \text{ „} \end{array} \right\}$	$N/_{10}$	NaHO-Lösung
2)	dgl.	+ Koch-Tub.	0,5 ccm		$\left\{ \begin{array}{l} 1,4 \\ 1,4 \end{array} \right\}$	„	dgl.
3)	„	+ M.-Tub.	0,5 ccm		$\left\{ \begin{array}{l} 2,3 \\ 2,3 \end{array} \right\}$	„	„
4)	„	+ Tetanustoxin	0,5 ccm		$\left\{ \begin{array}{l} 1,1 \\ 1,2 \end{array} \right\}$	„	„
5)	„	+ 2 Oesen	Mausleber		$\left\{ \begin{array}{l} 0,8 \\ 0,8 \end{array} \right\}$	„	„
6)	„	+ 2 „	„	+ Koch-Tub.	$\left\{ \begin{array}{l} 1,8 \\ 1,4 \end{array} \right\}$	„	„
				0,5 ccm		„	„
7)	„	+ 2 „	„	+ M.-Tub.	$\left\{ \begin{array}{l} 3 \\ 2,9 \end{array} \right\}$	„	„
				0,5 ccm		„	„
8)	„	+ 2 „	„	+ Tetanustoxin	$\left\{ \begin{array}{l} 1,3 \\ 1,1 \end{array} \right\}$	„	„
				0,5 ccm		„	„
9)	„	+ 2 „	„	+ Koch-Tub.	$\left\{ \begin{array}{l} 1,2 \\ 1,4 \end{array} \right\}$	„	„
				0,1 ccm		„	„
10)	„	+ 2 „	„	+ Tetanustoxin	$\left\{ \begin{array}{l} 1,1 \\ 0,9 \end{array} \right\}$	„	„
				0,1 ccm		„	„

Tabelle 6.

Gleich der vorhergehenden. Titrierung nach 70-stündigem Verbleiben im Brutschrank.

1)	2 ccm emulgiertes Oel				$\left\{ \begin{array}{l} 0,3 \text{ ccm} \\ 0,3 \text{ „} \end{array} \right\}$	$N/_{10}$	NaHO-Lösung
2)	dgl.	+ Koch-Tub.	0,5 ccm		$\left\{ \begin{array}{l} 1,2 \\ 1,2 \end{array} \right\}$	„	dgl.
3)	„	+ M.-Tub.	0,5 ccm		$\left\{ \begin{array}{l} 2,2 \\ 2,4 \end{array} \right\}$	„	„
4)	„	+ Tetanustoxin	0,5 ccm		$\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 1 \end{array} \right\}$	„	„
5)	„	+ 2 Oesen	Mausleber		$\left\{ \begin{array}{l} 0,7 \\ 0,5 \end{array} \right\}$	„	„
6)	„	+ 2 „	„	+ Koch-Tub.	$\left\{ \begin{array}{l} 1,8 \\ 2,2 \end{array} \right\}$	„	„
				0,5 ccm		„	„
7)	„	+ 2 „	„	+ M.-Tub.	$\left\{ \begin{array}{l} 2,4 \\ 2,2 \end{array} \right\}$	„	„
				0,5 ccm		„	„
8)	„	+ 2 „	„	+ Tetanustoxin	$\left\{ \begin{array}{l} 1,1 \\ 1,1 \end{array} \right\}$	„	„
				0,5 ccm		„	„
9)	„	+ 2 „	„	+ Koch-Tub.	$\left\{ \begin{array}{l} 0,8 \\ 0,8 \end{array} \right\}$	„	„
				0,1 ccm		„	„
10)	„	+ 2 „	„	+ Tetanustoxin	$\left\{ \begin{array}{l} 0,9 \\ 0,5 \end{array} \right\}$	„	„
				0,1 ccm		„	„

Tabelle 7.

Anderes Oel emulgiert mit  $N/_{10}$  NaHO-Säure (2 ccm Oel + 0,1 ccm NaHO) + Koch-Tub. Titrierung nach 16-stündigem Verbleiben im Brutschrank.

1)	2 ccm emulgiertes Oel				$\left\{ \begin{array}{l} 1,2 \text{ ccm} \\ 1,2 \text{ „} \end{array} \right\}$	$N/_{10}$	NaHO-Lösung
2)	dgl.	+ Koch-Tub	0,5 ccm		$\left\{ \begin{array}{l} 2,6 \\ 2,8 \end{array} \right\}$	„	dgl.
3)	„	+ 2 Oesen	Mausleber		$\left\{ \begin{array}{l} 2 \\ 1,8 \end{array} \right\}$	„	„
4)	„	+ 2 „	„	+ Koch-Tub.	$\left\{ \begin{array}{l} 2,6 \\ 3 \end{array} \right\}$	„	„
				0,5 ccm		„	„

Die Daten dieser zweiten Reihe von Versuchen bezeugen im Gegensatz zu den vorhergehenden, daß keines der in den Versuchen angewandten Toxine in Gegenwart des emulgierten Oeles einen evidenten Einfluß auf die Lipolyse durch Organe ausübt. Eine geringe Beschleunigung der Lipolyse könnte man nur in der Tabelle 5 beim Maragliano-Tuberkulin und in der Tabelle 6 beim Kochschen Tuberkulin wahrnehmen. Auf diese isolierten Fälle können wir jedoch kein besonderes Gewicht legen.

#### Versuche mit Merckschem Lecithin und Lecithin-Agfa, schwach-sauer auf Phenolphthalein.

Das Lecithin wurde in der gleichförmigen Aufschwemmung in 2-proz. destillierten und sterilisierten Wassers verwendet. Die Mischungen mit Organ und Toxinen wurden 16–22 Stunden im Brutschrank aufbewahrt. Die Titrierungen geschahen mittels  $N/_{10}$  NaHO-Lösung (Phenolphthalein als Indikator).

Aus dieser dritten Reihe von Versuchen ergibt sich, daß die verwendeten Toxine nicht einmal in Gegenwart von Lecithin einen verwertbaren Einfluß auf die Lipolyse durch Organe ausüben.

Tatsächlich stellen die in den Mischungen von Organ und Toxin erhaltenen Ziffern beinahe stets die Summe den Ziffern der Lipolyse der separaten Mischungen von Lecithin + Organ, Lecithin + Toxin dar, selbstredend abzüglich der Säurekontrollziffer, die bloß Lecithin enthält.

Da ich im Zweifel war, ob die Resultate der Versuche, die mit emulgiertem Oel und Lecithin gemacht wurden, von der Dauer des Ver-

Tabelle 8.

2-proz. Aufschwemmung alten Merckschen Lecithins + Kochschem Tuberkulin. Titrierung nach 16-stündigem Verbleiben im Brutschrank.

1)	5 ccm Lecithinaufschw. + 1 ccm Toluol	$\left\{ \begin{array}{l} 0,4 \text{ ccm} \\ 0,4 \text{ „} \end{array} \right\}$	$N/_{10}$ NaHO-Lösung
2)	dgl. + Koch-Tub. 0,5 ccm	$\left\{ \begin{array}{l} 0,8 \text{ „} \\ 0,8 \text{ „} \end{array} \right\}$	dgl.
3)	„ + 3 Oesen Mauseleber	$\left\{ \begin{array}{l} 0,6 \text{ „} \\ 0,6 \text{ „} \end{array} \right\}$	„
4)	„ + 3 „ „ + Koch-Tub.	$\left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ „} \\ 0,5 \text{ ccm} \end{array} \right\}$	„
		$\left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ „} \\ 1 \text{ „} \end{array} \right\}$	„

Tabelle 9.

Frische 2-proz. Lecithinaufschwemmung + Kochschem Tub., Maragliano-Tub., Tetanustoxin. Titrierung nach 18-stündigem Verbleiben im Brutschrank.

1)	3 ccm Lecithin-aufschwemmung	$\left\{ \begin{array}{l} 0,1 \text{ ccm} \\ 0,1 \text{ „} \end{array} \right\}$	$N/_{10}$ NaHO-Lösung
2)	dgl. + Koch-Tub. 0,5 ccm	$\left\{ \begin{array}{l} 0,7 \text{ „} \\ 0,7 \text{ „} \end{array} \right\}$	dgl.
3)	„ + M.-Tub. 0,5 ccm	$\left\{ \begin{array}{l} 1,6 \text{ „} \\ 1,6 \text{ „} \end{array} \right\}$	„
4)	„ + Tetanustoxin 0,6 ccm	$\left\{ \begin{array}{l} 0,3 \text{ „} \\ 0,4 \text{ „} \end{array} \right\}$	„
5)	„ + 3 Oesen Mauseleber	$\left\{ \begin{array}{l} 0,6 \text{ „} \\ 0,4 \text{ „} \end{array} \right\}$	„
6)	„ + 3 „ „ + Koch-Tub. 0,5 ccm	$\left\{ \begin{array}{l} 1,2 \text{ „} \\ 1,2 \text{ „} \end{array} \right\}$	„
7)	„ + 3 „ „ + M.-Tub. 0,5 ccm	$\left\{ \begin{array}{l} 2,3 \text{ „} \\ 2,2 \text{ „} \end{array} \right\}$	„
8)	„ + 3 „ „ + Tetanustoxin 0,6 ccm	$\left\{ \begin{array}{l} 0,9 \text{ „} \\ 1 \text{ „} \end{array} \right\}$	„

10\*



Tabelle 10.

FrISChe 2-proz. Afga-Lecithinaufschwemmung + Koch-Tub., Maragliano-Tub., Tetanustoxin. Titrierung nach 22-stündigem Verbleiben im Brutschrank.

1)	3 ccm Lecithin-aufschwemmung				{ 0,4 ccm } N/1% NaHO-Lösung
					{ 0,4 " } dgl.
2)	dgl.	+ Koch-Tub. 0,5 ccm			{ 1,3 " } dgl.
					{ 1,2 " } " "
3)	"	+ M.-Tub. 0,8 ccm			{ 2,4 " } " "
					{ 2,3 " } " "
4)	"	+ Tetanustoxin 0,5 ccm			{ 0,6 " } " "
					{ 0,6 " } " "
5)	"	+ 3 Oesen Mausleber			{ 1,1 " } " "
					{ 1,3 " } " "
6)	"	+ 3 " " + Koch-Tub. 0,5 ccm			{ 1,8 " } " "
					{ 2,1 " } " "
7)	"	+ 3 " " + M.-Tub. 0,8 ccm			{ 3,2 " } " "
					{ 3,2 " } " "
8)	"	+ 3 " " + Tetanustoxin 0,5 ccm			{ 1,5 " } " "
					{ 1,5 " } " "

Tabelle 11.

2-proz. Merck-Lecithinaufschwemmung + Koch-Tub., Maragliano-Tub., Tetanustoxin. Titrierung nach 1/2-stündigem Verbleiben im Brutschrank.

1)	3 ccm Lecithin-aufschwemmung				{ 0,3 ccm } N/1% NaHO-Lösung
					{ 0,3 " } dgl.
2)	dgl.	+ Koch-Tub. 0,5 ccm			{ 0,8 " } dgl.
					{ 0,8 " } " "
3)	"	+ M.-Tub. 0,5 ccm			{ 1,4 " } " "
					{ 1,5 " } " "
4)	"	+ Tetanustoxin 0,25 ccm			{ 0,5 " } " "
					{ 0,5 " } " "
5)	"	+ dicke Oese Mausleber			{ 0,4 " } " "
					{ 0,4 " } " "
6)	"	+ " " " + Koch-Tub. 0,5 ccm			{ 1 " } " "
					{ 1 " } " "
7)	"	+ " " " + M.-Tub. 0,5 ccm			{ 1,6 " } " "
					{ 1,6 " } " "
8)	"	+ " " " + Tetanustoxin 0,25 ccm			{ 0,6 " } " "
					{ 0,6 " } " "

Tabelle 12.

1-proz. Merck-Butyrinaufschwemmung + Koch-Tub., Maragliano-Tub., Tetanustoxin. Titrierung nach 16-stündigem Verbleiben im Brutschrank.

1)	5 ccm Butyrin-aufschwemmung				{ 0,5 ccm } 1/5% Natrium-karbonat-lösung
					{ 0,5 " } " "
2)	dgl.	+ Koch-Tub. 0,5 ccm			{ 2,05 " } dgl.
					{ 2,05 " } " "
3)	"	+ M.-Tub. 0,5 ccm			{ 4,35 " } " "
					{ 4,4 " } " "
4)	"	+ Tetanustoxin 0,25 ccm			{ 0,55 " } " "
					{ 0,55 " } " "
5)	"	+ 1 Oese Mausleber			{ 8,1 " } " "
					{ 6,2 " } " "
6)	"	+ 1 " " + Koch-Tub. 0,5 ccm			{ 15,5 " } " "
					{ 15,5 " } " "
7)	"	+ 1 " " + M.-Tub. 0,5 ccm			{ 18,5 " } " "
					{ 18,7 " } " "
8)	"	+ 1 " " + Tetanustoxin 0,25 ccm			{ 7,7 " } " "
					{ 8,4 " } " "

bleibens im Brutschranke abhängen, machte ich noch zwei Versuche, einen mit Lecithin und den anderen mit Butyrin. Die Titrierung geschah im ersten Falle nach einem  $\frac{1}{2}$ -stündigen, und im zweiten nach einem 18-stündigen Verweilen im Brutschranke.

Die Daten, die ich in den letzten zwei Versuchen erhalten habe, bestätigen nur die vorhergehenden, und zwar daß in Gegenwart von Lecithin seitens der verschiedenen in den Versuchen verwendeten Toxine gar keine aktive Beschleunigung der Lipolyse durch Organe wahrgenommen wird, während diese Aktivität in Gegenwart von Butyrin noch deutlicher zutage kommt.

\* \* \*

Die negativen Resultate, die infolge von Arbeiten mit Oel und Lecithin erhalten wurden, können von der eigenartigen Zusammensetzung solcher Lipoide oder ihrer geringen Empfindsamkeit bedingt sein. Letztgenannte Hypothesen könnte verwertet werden, da Barlocco im Diphtherietoxin eine Beschleunigung der Lipolyse durch Organe in bezug auf Oel und Lecithin wahrgenommen hat. Die Aktivität war bedeutend geringer, als in dem von ihm gemachten Versuche mit Merckschem Monobutyryl (2).

Allenfalls halte ich die konstanten und rein positiven Resultate, die ich, mit Butyrin experimentierend, erhalten habe, für genügend, um allgemein behaupten zu können, daß sich sowohl Tuberkulin (sei es Kochsches oder wässriges Maragliano-Tuberkulin), als auch Tetanustoxin in der Lipolyse durch Organe als echte positive Katalysatoren verhalten, indem sie die lipolytische Aktivität, welche die Tierorgane an und für sich bereits besitzen, bedeutend verstärken.

#### Literatur.

- 1) Pesci, Autolisi e tubercolina. Autolisi e tetanotossina. (Pathologica. 1911. Aprile.)
- 2) Barlocco, Diphtherietoxin und Lipolyse durch Organe. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 58. 1911.)
- 3) Neuberg, Lipolyse und Agglutination. (Biochem. Zeitschr. Bd. 2. 1908. p. 400.)
- 4) — u. Rosenberg, Lipolyse und Agglutination und Hämolyse. (München. med. Wochenschr. 1907. Januar.)
- 5) — u. Reicher, Lipolyse und Agglutination und Hämolyse. (München. med. Wochenschrift. 1907.)
- 6) Sur l'existence d'une ferment soluble dans les cultures de bacilles de Koch. (Compt. rend. hebdom. Soc. de Biol. T. 53. No. 11.)

*Nachdruck verboten.*

## Ueber die Beziehung zwischen der v. Pirquetschen Reaktion und den Tuberkelbacillen im Blut.

[Aus dem Ishigami-Institut für Infektionskrankheiten, Osaka, Japan.]

Von Dr. Yoshio Suzuki und Dr. Zenzo Takaki.

Es ist bekannt, daß es sowohl für die Behandlung als auch für die Vorbeugung sehr günstig ist, wenn man die Tuberkulose schon in ihrem Anfangsstadium genau diagnostizieren kann. Als ein frühzeitiges und sicheres Diagnostikum der Tuberkulose wurde früher nur die Kochsche Tuberkulinreaktion angewendet, welche eine große und wichtige Rolle

gespielt hat. Aber wiewohl die Reaktion sehr wichtig war, blieb ihre Anwendung beschränkt, weil man zum praktischen Gebrauch dieser Methode einer bestimmten Vorbereitung und auch einiger Einrichtungen bedurfte; zuweilen trat die Reaktion auch zu stark auf, wodurch die Kranken zu leiden hatten.

Die Agglutinationsprobe und der Präzipitationsversuch waren als Diagnostikum für die Tuberkulose nicht gut anwendbar, da sie keine sicheren Resultate ergaben.

v. Pirquet beobachtete nun die Hauterscheinungen bei der Pockenschutzimpfung und sah, daß eine Hautreaktion auftrat, wenn man eine zweite Impfung während der Zeit erfolgen ließ, in der noch etwas Immunsubstanz von der ersten Impfung sich im Körper befand. Dieselbe Hautreaktion trat nun auf, als er die Haut eines an Tuberkulose Erkrankten mit Kochschem Tuberkulin impfte.

Seit v. Pirquet seine Hautimpfungsmethode als ein wichtiges und frühzeitiges Diagnostikum der Tuberkulose empfohlen hatte, hat man sich bemüht, auf experimentellem Wege die Methode nachzuprüfen, und dabei haben sich verschiedene Modifikationen ergeben. Zum praktischen Gebrauch haben sich uns am besten die folgenden bewährt: Die conjunctivale Tuberkulinreaktion oder die sogenannte Ophthamoreaktion nach Wolff-Eisner und Calmette, eine Einreibungsmethode der Tuberkulinsalbe nach Moro, eine Intradermo-Tuberkulinreaktion nach Mantoux und Roux und eine subkutane Tuberkulininjektion nach Saathoff.

Nach unserer Erfahrung aber eignet sich die v. Pirquetsche Methode, also die Kutanreaktion, als einfach und sicher, am besten zu diesem Zweck.

Nun hatte man aber der Sicherheit der v. Pirquetschen Reaktion mißtraut, weil man bemerkt hatte, daß sie nicht nur in allen den Fällen, die nach den Symptomen als tuberkulöse erkannt waren (außer sehr späten Stadien), positiv war, sondern auch sehr oft bei Individuen, bei denen man keine tuberkulösen Symptome nachweisen konnte. Früher hatte man bei der Leichensektion die begrenzten Tuberkuloseherde, die in geheiltem Zustande bleibend sind, schon viel gesehen. So beobachtete Nägeli diese Erscheinung bei 98 Proz. und Burkhardt bei 91 Proz. Wir müssen berücksichtigen, daß die Tuberkulose sehr häufig vorkommt. Aber kann man so gleich sagen, daß die v. Pirquetsche Probe auch auf diese oben besprochenen unverkennbaren Tuberkuloseherde gewirkt hat? Wir werden diese Frage weiter prüfen.

Seit Schnitter seinen Versuch, daß man durch die Anwendung von Antiformin die Tuberkelbacillen aus dem Blut sehr leicht nachweisen kann, empfohlen hatte, hat man denselben oft nachgemacht. Schnitter selbst erhielt 12 positive Resultate unter 38 Fällen (32 Proz.), Jessen und Rabinowitsch 12 positive unter 36 (33 Proz.), Lippmann 11 positive unter 25 (44 Proz.), Rosenberger 49 positive unter 49 (100 Proz.) und Kurashige 155 positive unter 155 Fällen (100 Proz.).

Wie wir sehen, sind die Resultate verschieden. Aber wenn man, wie Rosenberger und Kurashige gesagt haben, in allen Fällen der Tuberkulose die Tuberkelbacillen im Blut nachweisen kann und ferner in den latenten Fällen, in denen man gar keine tuberkulöse Erscheinung erkennen kann, auch positive Resultate erhält, so ist es sehr interessant, die Beziehungen zwischen den Blutversuchsergebnissen und der v. Pirquetschen Reaktion zu studieren. Findet man, daß beide Resultate stets

parallel gehen, so kann man annehmen, daß die v. Pirquetsche Reaktion ein sicheres Kennzeichen der Tuberkulose ist. Durch diese einfache Hautreaktion können wir dann die Tuberkulose frühzeitig diagnostizieren, und wir haben dadurch nicht nur ein sehr günstiges Vorbeugungsmittel, sondern können die Erkrankten auch frühzeitig behandeln. Mit dieser Aufgabe haben wir uns seit 2 Jahren im Institut an Kranken und Gesunden beschäftigt.

Obwohl die Untersuchungsmethode nicht so kompliziert ist, waren die Resultate im Anfang ungenau. Wir glauben, daß es an einem Fehler in der Technik gelegen hat, wie wir ihn früher bei der Opsoninprüfung auch begangen hatten. Die Verbesserung der Prüfungsmethode und die Erfahrungen in der Technik bewirkten, daß wir später ganz sichere Erfolge zu verzeichnen hatten. Unsere Methode ist eine verbesserte Schnittersche Antiforminmethode, eine Modifikation nach Stäubli.

### Die Prüfungsmethode.

1) 1 ccm Blut, das durch Venenpunktion gewonnen ist, wird in ein sterilisiertes Zentrifugen-Glasröhrchen gebracht, das mit 2 ccm einer 1-proz. Lösung von zitronensaurem Natron gefüllt ist. Dieses wird einigemal geschüttelt. Dann setzt man ca. 5 ccm einer 1-proz. Essigsäurelösung hinzu, mischt mit dem kleinen Glasstäbchen ca. 5 Minuten, wodurch die roten Blutkörperchen sich auflösen und die Lösung eine hellrote Farbe zeigt. Wenn diese Lösung noch ein paar Minuten ruhig steht, verändert sich die Farbe bis zu dunkelrot;

2) dann zentrifugiert man gleich ca. 10 Minuten lang, zieht die klare Oberflüssigkeit ab, und gewinnt einen dunkelrotbraunen Absatz;

3) darauf setzt man ca. 10 ccm einer 30-proz. Antiforminlösung hinzu, erwärmt die Mischung ca. 3 Minuten etwas über der Flamme und mischt sie gut. Durch die Auflösung der formbildenden Substanzen zeigt die Lösung eine hellgelbliche Farbe;

4) alsdann zentrifugiert man wieder ca. 15 Minuten und bekommt einen kleinen Absatz, den man kaum sehen kann. Die Oberflüssigkeit gießt man ab;

5) zum Waschen gießt man ca. 10 ccm sterilisierten, destillierten Wassers auf den kleinen Absatz und zentrifugiert ca. 10 Minuten; dann bekommt man eine noch winziger gewordene Menge des grauen Sedimentes;

6) der Bodensatz, der so gering ist, daß man ihn kaum sehen kann, wird auf den Objektträger gestrichen, fixiert und nach Ziehl-Gabbet gefärbt.

Zuweilen passiert es, daß so wenig Sediment vorhanden ist, daß es schwer ist, es zu finden und ein Strichpräparat zu bekommen. Wir haben deswegen mit Hilfe eines kleinen Kapillarröhrchens, das durch Ausziehen über der Flamme aus einem Glasröhrchen von ca. 8 mm Durchmesser hergestellt ist und dessen oberes weiteres Ende mit einer Gummikappe armiert ist, das Sediment mit der Flüssigkeit zusammen aufgesaugt; dann wird es ausgedrückt, auf ein Objektglas gestrichen, fixiert usw. Zum Gebrauch werden die Kapillarröhrchen immer neu hergestellt.

Zum Versuch haben wir nicht nur das Blut ganz keimfrei gewonnen, sondern auch die gebrauchten Instrumente, Reagentien, Wasser und alles andere möglichst steril behandelt, um die anderen säurefesten Bacillen

nicht hineinkommen zu lassen. Ferner haben wir, um sicher zu unterscheiden, ob in dem Präparat Tuberkelbacillen sind oder nicht, die Entfärbungsmethode mit 3-proz. Salzsäurealkohol, die Muchsche Methode und ihre Modifikationen sowohl nach Hermann als auch nach Gasiss angewendet. Natürlich waren unsere Tuberkelbacillen positiv nach diesen Nachweisen. Dann haben wir noch weiter das Material auf Meerschweinchen geimpft und genau gesehen, daß die Versuchstiere tuberkulös erkrankt sind. Zum Tierversuch haben wir mehr als 5 ccm Blut des Patienten gewonnen und nach der oben beschriebenen Vorbehandlung intraperitoneal und subkutan injiziert.

Den Erfolg unserer Arbeit an den Patienten in 517 Fällen zeigt die Tabelle. Wir sehen, daß die v. Pirquetsche Reaktion und das Vorhandensein der Tuberkelbacillen im Blut immer parallel gehen.

Es war sehr interessant, daß sich bei denjenigen Kranken, deren Blutuntersuchung anfangs negative Resultate ergeben hatte, trotzdem schon im Sputum und in den Faeces Tuberkelbacillen nachgewiesen waren und die v. Pirquetsche Reaktion positiv war, bei einem nochmaligen Versuche auch im Blute Tuberkelbacillen nachweisen ließen.

7 Fälle, deren Blutuntersuchung das erste Mal negativ ausfiel und deren nochmalige Untersuchung nicht möglich war, haben wir als negativ gerechnet.

38 Fälle, bei denen die v. Pirquetsche Reaktion negativ war, trotz der positiven Resultate aus dem Blut, dem Sputum und in den Faeces, ließen physikalisch das spätere Stadium der Tuberkulose, und zwar Dyskrasie, erkennen.

Von einem Falle (Tabelle I, No. 205) kann man vermuten, daß es sich nicht um Tuberkulose handelte, da Blut, Sputum und Faeces negative Resultate ergaben, trotzdem deutliche Symptome einer Pleuritis bestanden.

Aus Tabelle I ersehen wir, daß 38 Fälle von dem späteren Stadium und der eine eben besprochene Fall von Pleuritis, bei dem es sich nicht um Tuberkulose handelte, miteingerechnet sind, also 39 von den gesamten 517 Fällen abgerechnet werden müssen. Unter den übrigbleibenden 478 Fällen finden sich dann noch 7 negative Fälle, deren nochmalige Untersuchung unmöglich war; man erhielt also 98,5 Proz., ein Ergebnis, daß den Resultaten von Rosenberger und Kurashige ungefähr entspricht.

Bei 34 angeblich gesunden Menschen hat Kurashige 20 positive Resultate gesehen; bei weiteren 5 von ihnen konnte er mehrere Monate später deutliche Tuberkulose nachweisen. Wir hatten, wie Tabelle II zeigt, bei 54 Personen 28 positive Resultate, und mehrere Monate später trat bei 4 von diesen Lungentuberkulose, bei 2 tuberkulöse Pleuritis und bei weiteren 2 tuberkulöse Peritonitis auf. Bei 20 Personen, die nach mehr als 10 Monaten noch in gesundem Zustande waren, haben wir die Opsonine bestimmt, und gefunden, daß der opsoninische Index bei ihnen höher war als bei den normalen. Von 3 Fällen aus Tabelle II, bei denen die Blutuntersuchung negativ und die Hautreaktion positiv war, kann man annehmen, daß es sich um technische Fehler handelt.

Tabelle I.  
Tuberkulöse Kranken.

Lfd. No.	Name und Geschlecht	Lebensalter	Lokale Erkrankung	TB. im Blut	Pirquetsche Reaktion	TB. im Sputum	TB. in den Faeces	Bemerkungen
1	H. M., m.	23	Beide Spitzen, rechtsseitige Pleuritis	+	+	—	—	Starb 4 Wochen später
2	I. M., m.	27	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linke Spitze	+	+	+	—	
3	Y. D., m.	37	Beide Lungen ganz	+	—	+	+	
4	Y. G., m.	31	Rechte Spitze, links oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	+	
5	N. M., m.	21	Linke Spitze, linksseitige Pleuritis	+	+	+	—	Nochmalige Untersuchung war unmöglich
6	H. S., m.	53	Unterlappen r. u. l., beiders. Pleuritis	+	+	—	—	
7	S. N., m.	54	Rechts oben $\frac{1}{3}$	—	+	+	/	
8	I. W., m.	15	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linksseitige Pleuritis	+	+	+	—	
9	M. M., m.	27	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	—	—	Hohes Fieber, Dyskrasie, tot
10	N. M., m.	30	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linke Spitze	+	+	—	/	
11	N. O., w.	19	Rechte Spitze	+	+	—	—	
12	K. T., w.	31	Rechte Spitze	+	+	—	—	
13	Y. R., m.	20	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	—	—	
14	A. D., m.	23	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
15	M. W., m.	24	Rechte Spitze	+	+	—	—	
16	M. D., m.	48	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	—	—	
17	S. N., m.	29	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linksseitige Pleurit.	+	+	—	—	
18	I. M., m.	45	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linksseitige Pleurit.	+	+	—	—	
19	O. N., m.	31	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , rechtsseit. Pleurit.	+	+	—	—	
20	N. W., m.	31	Rechte Spitze, linksseitige Pleuritis	+	+	—	—	
21	S. I., m.	41	Beide Lungen oben $\frac{1}{3}$	+	—	+	+	
22	K. R., m.	21	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	—	—	
23	A. K., m.	42	Rechte Spitze, linksseitige Pleuritis	+	+	—	—	
24	K. M., m.	17	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linksseitige Pleuritis	+	+	+	+	
25	K. T., m.	33	Linke Spitze	+	+	—	—	Fieber, Dyskras.
26	I. N., w.	51	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
27	S. D., m.	25	Rechte Spitze	+	+	—	—	
28	Y. S., m.	12	Rechte Spitze, linksseitige Pleuritis	+	+	—	—	
29	I. Y., w.	19	Rechte Spitze	+	+	—	—	
30	T. T., m.	19	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	—	—	
31	Y. T., m.	19	Rechte Spitze	+	+	+	—	
32	O. T., w.	16	Rechte Spitze, rechtsseitige Pleuritis	+	+	—	—	
33	I. R., w.	18	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	+	
34	K. S., m.	16	Linke Spitze, linksseitige Pleuritis	+	+	—	—	
35	U. D., m.	25	Links oben $\frac{1}{3}$	+	+	—	—	
36	K. T., w.	21	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
37	K. T., w.	30	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
38	N. N., m.	20	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linke Spitze	+	+	—	—	
39	M. O., m.	26	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
40	U. D., w.	49	Beide Lungen ganz	+	—	+	—	Starb 8 Monate später
41	N. K., w.	36	Rechte Spitze, rechtsseitige Pleuritis	+	+	—	—	
42	M. R., m.	23	Rechts oben $\frac{1}{2}$	+	+	+	—	
43	S. Z., w.	23	Rechte Spitze	+	+	—	—	
44	T. T., w.	26	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , rechtsseit. Pleurit., Darm	+	—	+	+	
45	W. B., m.	16	Rechte Spitze, rechtsseitige Pleuritis	+	+	—	—	
46	T. K., m.	34	Rechts oben $\frac{2}{3}$	+	+	+	—	
47	T. K., w.	28	Rechte Spitze	+	+	—	—	

Zeichenerklärung: TB. = Tuberkelbacillen; m. = männliches Geschlecht; w. = weibliches Geschlecht. Rechts, links, Spitze usw. bedeuten diejenigen Abschnitte in den Lungen, die man nach den Symptomen als erkrankt bezeichnen konnte.



Lfd. No.	Name und Geschlecht	Lebensalter	Lokale Erkrankung	TB. im Blut	Pirquet'sche Reaktion	TB. im Sputum	TB. in den Faeces	Bemerkungen
48	T. D., m.	33	Rechts oben $\frac{1}{8}$ , rechtsseitige Pleuritis, linke Spitze	+	+	+	+	
49	M. G., m.	25	Rechts oben $\frac{1}{8}$	+	+	+	—	
50	M. W., w.	16	Linke Spitze	+	+	—	—	
51	T. K., m.	21	Rechts oben $\frac{1}{8}$	+	+	+	—	
52	T. C., w.	23	Links oben $\frac{1}{8}$ , linksseitige Pleuritis	+	+	+	—	
53	O. R., m.	34	Rechte Spitze	+	+	—	—	
54	Y. T., w.	24	Rechts oben $\frac{1}{8}$ , linksseitige Pleuritis	+	+	—	—	
55	S. T., m.	44	Linke Lunge ganz	—	+	+	/	Nochmalige Untersuchung war unmöglich
56	M. D., m.	30	Rechte Spitze, links oben $\frac{1}{8}$	+	+	—	/	
57	I. N., w.	26	Rechts oben $\frac{1}{8}$	+	+	—	/	
58	N. R., m.	22	Beide Lungen oben $\frac{1}{8}$ , Darm	+	—	+	+	Starb kurz nachher
59	O. T., m.	27	Rechts oben $\frac{1}{8}$ , linksseitige Pleuritis	+	+	+	/	
60	M. K., m.	19	Rechts oben $\frac{1}{8}$ , linksseitige Pleuritis, Darm	+	+	—	—	
61	Y. D., m.	44	Rechts oben $\frac{1}{8}$	+	+	—	/	
62	U. M., w.	30	Rechts oben $\frac{1}{8}$ , rechtsseit. Pleuritis	+	+	+	—	
63	Y. N., m.	20	Rechts oben $\frac{1}{8}$	+	+	—	/	
64	K. F., w.	23	Rechte Lunge ganz, links oben $\frac{1}{8}$ , Darm	+	—	+	+	Hohes Fieber, Anämie
65	K. K., m.	34	Linke Lunge ganz, rechts oben $\frac{1}{8}$ , Darm	+	—	+	+	Hohes Fieber, Dyskrasie
66	Y. D., w.	52	Rechts oben $\frac{1}{8}$ , links oben $\frac{1}{8}$ , linksseitige Pleuritis	+	+	+	+	
67	H. T., m.	23	Beide Spitzen, rechtsseitige Pleuritis	+	+	—	—	
68	M. T., m.	19	Links oben $\frac{1}{8}$	+	+	—	/	
69	T. D., m.	43	Rechts oben $\frac{1}{8}$	+	+	+	—	
70	N. M., m.	16	Links oben $\frac{1}{8}$ , linksseitige Pleuritis, rechte Spitze	+	+	+	+	
71	Y. K., w.	32	Rechts oben $\frac{1}{8}$ , beiderseit. Pleuritis	+	+	—	/	
72	I. M., m.	32	Rechte Lunge ganz	+	—	+	—	Hohes Fieber, später. Stadium
73	M. R., m.	53	Beide Unterlappen, beiders. Pleuritis	+	+	—	—	
74	O. R., m.	49	Rechts oben $\frac{1}{8}$	+	+	—	—	
75	N. O., w.	35	Links oben $\frac{1}{8}$	+	+	+	+	
76	O. S., w.	22	Linke Lunge ganz, rechtsseitige Pleuritis, Darm	+	+	+	+	
77	A. D., m.	23	Rechte Lunge schwach	+	+	+	—	
78	M. M., w.	27	Rechts oben $\frac{1}{8}$	+	+	—	—	
79	T. R., m.	21	Rechte Spitze	+	+	—	—	
80	M. M., m.	32	Linke Spitze	+	+	—	—	
81	Y. R., m.	20	Beide Spitzen	+	+	+	—	
82	T. T., w.	43	Rechts oben $\frac{1}{8}$	+	+	+	+	
83	S. O., w.	19	Rechte Spitze, linksseitige Pleuritis	+	+	—	—	
84	T. O., m.	34	Rechte Spitze, beiderseitige Pleuritis	+	+	—	—	
85	M. T., m.	18	Linke Spitze	+	+	—	—	
86	K. R., w.	25	Rechte Spitze	+	+	—	—	
87	F. R., w.	29	Linke Spitze, Darm	+	+	—	+	
88	F. T., m.	41	Rechts oben $\frac{1}{8}$ , linke Spitze, Larynx	+	+	+	/	
89	M. D., m.	23	Rechte Spitze	+	+	—	—	
90	Y. H., w.	31	Links oben $\frac{2}{8}$ , rechts oben $\frac{1}{8}$	+	+	+	+	
91	I. W., w.	33	Rechte Spitze	+	+	—	/	
92	Y. D., m.	31	Beide Spitzen, beiderseitige Pleuritis	+	+	—	—	
93	N. R., m.	32	Rechts oben $\frac{1}{8}$ , linke Spitze	+	+	+	/	
94	G. N., m.	22	Rechts oben $\frac{1}{8}$ , rechtsseit. Pleuritis	+	+	—	—	

Lfd. No.	Name und Geschlecht	Lebensalter	Lokale Erkrankung	TB. im Blut	Pirquetsche Reaktion	TB. im Sputum	TB. in den Faeces	Bemerkungen
95	O. T., m.	34	Links oben $\frac{1}{2}$ , rechts schwach	+	+	—	—	
96	O. T., m.	21	Rechte Spitze, linksseitige Pleuritis	+	+	—	—	
97	K. K., w.	24	Rechts oben $\frac{1}{2}$ , rechtsseit. Pleuritis	+	+	+	—	
98	K. S., m.	43	Links oben $\frac{1}{3}$	+	+	—	—	
99	S. M., m.	33	Rechts oben $\frac{1}{2}$ , linke Spitze	+	+	+	—	
100	K. B., m.	55	Rechts oben $\frac{1}{2}$ , linke Spitze	+	+	+	—	
101	H. D., m.	43	Linke Spitze	+	+	—	—	
102	M. R., m.	30	Rechts oben $\frac{1}{2}$ , rechtsseitige Pleuritis	+	+	+	—	
103	M. D., m.	30	Beide Spitzen, beiderseitige Pleuritis	+	+	+	—	
104	A. D., m.	31	Rechte Spitze, beiderseitige Pleuritis	+	+	—	—	
105	S. K., w.	24	Links oben $\frac{1}{3}$ , rechte Spitze, Darm	+	+	+	+	
106	T. C., w.	20	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	—	—	
107	T. Y., w.	31	Links oben $\frac{1}{3}$ , rechts oben $\frac{1}{2}$	+	+	—	—	
108	T. R., m.	37	Rechte Spitze, links schwach	+	+	—	—	
109	I. N., m.	26	Links oben $\frac{1}{3}$ , rechte Spitze	+	+	+	—	
110	H. S., m.	21	Beide Lungen oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	Begleitet von Distoma pulmonale
111	N. T., m.	49	Links oben $\frac{1}{3}$ , rechte Spitze	+	+	+	—	
112	O. M., m.	32	Rechts oben $\frac{1}{2}$ , links schwach	+	+	+	—	
113	J. W., m.	38	Rechte Spitze, rechtsseitige Pleuritis	+	+	—	—	
114	N. R., m.	25	Rechte Spitze, rechtsseitige Pleuritis	+	+	—	—	
115	Y. R., m.	20	Beide Spitzen	+	+	—	—	
116	K. O., m.	30	Linke Spitze	+	+	+	—	
117	M. K., w.	28	Rechte Spitze, Niere	+	+	+	—	
118	K. K., m.	19	Rechte Spitze, rechtsseitige Pleuritis	+	+	+	—	
119	Y. D., m.	49	Beide oben $\frac{1}{3}$	+	—	+	+	Hohes Fieber, Dyskrasie
120	M. B., m.	20	Beide oben $\frac{1}{2}$	+	+	+	—	
121	Y. B., m.	41	Rechts oben $\frac{1}{2}$	+	+	—	—	
122	Y. T., m.	21	Beide Spitzen	+	+	—	—	
123	Y. C., m.	34	Linke Spitze, rechts schwach	+	+	—	—	
124	S. N., w.	15	Rechte Spitze	+	+	—	—	
125	O. D., w.	18	Rechte Spitze, rechtsseitige Pleuritis	+	+	—	—	
126	T. B., m.	30	Rechts oben $\frac{1}{3}$	—	+	+	—	Nochmalige Untersuchung war unmöglich
127	N. N., m.	24	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linke Spitze	+	+	+	—	
128	T. M., m.	30	Links oben $\frac{1}{3}$ , rechte Spitze	+	+	+	—	
129	I. R., w.	18	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	+	
130	T. M., m.	43	Rechte Spitze, links oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
131	T. N., m.	28	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	—	—	
132	W. T., m.	18	Rechts oben $\frac{1}{2}$	+	+	+	—	
133	K. Y., m.	41	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
134	M. M., m.	30	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , rechtsseit. Pleuritis	+	+	+	—	
135	N. M., w.	29	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	—	—	
136	B. T., m.	18	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linksseitige Pleuritis	+	+	+	—	
137	M. D., m.	20	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linksseitige Pleuritis	+	+	+	—	
138	Y. W., m.	21	Rechts oben, $\frac{1}{3}$ , rechtsseit. Pleuritis, linke Spitze	+	+	+	—	
139	K. N., m.	25	Beide Spitzen	+	+	—	—	
140	S. N., m.	28	Linke Spitze	+	+	—	—	
141	N. T., m.	43	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linke Spitze	+	+	+	—	
142	O. D., w.	17	Rechte Spitze, linksseitige Pleuritis	+	+	—	—	
143	H. O., m.	22	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	—	—	
144	U. T., w.	37	Links oben $\frac{1}{3}$ , rechte Spitze	+	+	+	—	
145	N. T., m.	41	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linke Spitze	+	+	+	—	
146	M. T., m.	31	Links oben $\frac{1}{3}$ , linksseitige Pleuritis, rechte Spitze	+	+	+	—	

Lfd. No.	Name und Geschlecht	Lebensalter	Lokale Erkrankung	TB. im Blut	Pirquetsche Reaktion	TB. im Sputum	TB. in den Faeces	Bemerkungen
147	S. M., m.	26	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linke Spitze, linksseitige Pleuritis	+	+	+	/	
148	M. M., m.	21	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , links oben schwach	+	+	—	/	
149	S. N., m.	20	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , rechtsseit. Pleuritis	+	+	—	—	
150	R. N., m.	19	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linke Spitze	+	+	—	/	
151	T. D., w.	25	Rechte Spitze, beiderseitige Pleuritis	+	+	—	—	
152	N. M., m.	15	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linke Spitze, linksseitige Pleuritis	+	+	+	+	
153	T. T., w.	43	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	+	
154	K. G., w.	16	Rechte Spitze	+	+	—	—	
155	N. R., m.	24	Rechte Spitze	+	+	—	—	
156	N. G., m.	32	Rechte Lunge ganz, rechtsseitige Pleuritis, links unten $\frac{1}{3}$	+	—	+	+	Starb kurz darauf
157	I. U., m.	46	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , rechtsseitige Pleuritis, links oben schwach	+	+	—	—	
158	O. K., m.	19	Rechte Spitze	+	+	—	/	
159	I. I., m.	49	Links oben $\frac{1}{3}$ , linksseitige Pleuritis	+	+	—	—	
160	K. B., m.	28	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	—	—	
161	T. C., m.	20	Rechte Spitze	+	+	—	—	
162	Y. D., w.	35	Linke Spitze	+	+	—	/	
163	M. T., m.	65	Rechte Spitze	+	+	—	/	
164	Y. N., m.	29	Links oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	/	
165	A. D., w.	32	Links oben $\frac{1}{2}$ , linksseitige Pleuritis, rechte Spitze	+	+	+	+	
166	N. R., m.	17	Linke Spitze, linksseitige Pleuritis	+	+	—	—	
167	Y. K., m.	43	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	+	
168	N. H., m.	22	Rechte Spitze, beiderseitige Pleuritis	+	+	—	/	
169	H. N., w.	16	Beide Lungen oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
170	I. D., w.	19	Links oben $\frac{2}{3}$ , rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
171	M. R., m.	15	Rechts oben $\frac{2}{3}$ , linke Spitze, Darm	+	+	+	+	
172	H. C., m.	34	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linke Spitze	+	+	+	+	
173	K. I., m.	26	Beide Lungen oben $\frac{1}{3}$ , beiders. Pleur.	+	+	—	—	
174	H. S., m.	19	Links oben $\frac{1}{3}$ , rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
175	Y. S., m.	18	Linke Lunge ganz, rechts oben $\frac{1}{3}$	+	—	+	+	Dyskrasie
176	T. W., w.	33	Rechts oben $\frac{2}{3}$	+	+	+	+	
177	M. K., m.	19	Rechte Spitze, beiderseitige Pleuritis	+	+	—	—	
178	I. T., m.	22	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linksseitige Pleuritis	+	+	+	+	
179	N. M., w.	17	Beide Lungen oben $\frac{1}{3}$ , Darm	+	+	+	+	tot
180	T. R., m.	45	Linksseitige Pleuritis	+	+	—	—	
181	T. S., w.	31	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , links oben $\frac{1}{2}$	+	+	—	—	
182	K. S., m.	19	Links oben $\frac{1}{3}$ , linksseitige Pleuritis	+	+	+	—	
183	A. M., m.	21	Beide Lungen oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
184	N. O., w.	35	Links oben $\frac{2}{3}$ , Darm	+	—	+	+	Hohes Fieber, Dyskrasie
185	A. K., w.	44	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	+	
186	A. T., m.	25	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	—	—	
187	T. Y., m.	23	Rechte Spitze, rechtsseitige Pleuritis	+	+	—	/	
188	K. K., m.	19	Rechte Spitze, rechtsseitige Pleuritis	+	+	—	—	
189	N. I., m.	29	Rechte Spitze	+	+	+	—	
190	S. I., m.	36	Rechte Spitze	+	+	—	—	
191	N. Y., w.	15	Rechte Spitze, rechtsseitige Pleuritis	+	+	—	—	
192	S. R., m.	36	Beiderseitige Pleuritis	+	+	—	—	
193	N. S., m.	21	Rechte Spitze, linksseitige Pleuritis	+	+	—	/	
194	K. R., w.	21	Linke Spitze	+	+	—	/	
195	Y. N., m.	24	Linke Spitze	+	+	—	—	
196	M. O., w.	24	Rechte Spitze	+	+	—	—	
197	D. R., m.	44	Rechts oben $\frac{2}{3}$ , linke Spitze	+	+	—	—	
198	W. D. m.	36	Links oben $\frac{1}{3}$ , rechte Spitze, rechtsseitige Pleuritis	+	+	+	/	

Lfd. No.	Name und Geschlecht	Lebensalter	Lokale Erkrankung	TB. im Blut	Pirquetsche Reaktion	TB. im Sputum	TB. in den Faeces	Bemerkungen
199	H. T., w.	30	Links oben $\frac{1}{8}$ , Rechts oben $\frac{1}{8}$	+	+	+	+	
200	T. K., m.	55	Rechts oben $\frac{1}{8}$	+	+	—	—	
201	K. G., w.	47	Linke Spitze, beiderseitige Pleuritis, Peritonitis	+	+	+	—	
202	S. I., m.	25	Rechte Spitze	+	+	—	—	
203	M. N., w.	39	Rechte Spitze	+	+	—	—	
204	K. D., m.	26	Links oben $\frac{1}{8}$ , rechte Spitze	+	+	+	+	tot
205	T. K., m.	59	Links oben $\frac{1}{8}$ , rechtsseit. Pleuritis	+	+	+	—	
206	Y. C., w.	32	Links oben $\frac{1}{2}$ , rechts oben schwach	+	+	—	—	
207	T. N., m.	26	Rechte Spitze	+	+	+	—	
208	O. N., w.	49	Linksseitige Pleuritis exsudativa	—	—	—	—	
209	K. T., w.	14	Linke Spitze, Darm	+	+	—	+	
210	O. N., m.	12	Rechte Spitze, linksseitige Pleuritis	+	+	—	—	
211	Y. W., m.	33	Beiderseitige Pleuritis	+	+	—	—	
212	K. R., m.	49	Rechts oben $\frac{1}{2}$ , linke Spitze, Larynx	+	+	+	—	
213	N. G., m.	44	Rechte Spitze	+	+	—	—	
214	K. R., m.	33	Rechts oben $\frac{1}{8}$ , rechtsseit. Pleuritis	+	+	+	—	
215	T. I., m.	24	Linke Spitze, linksseitige Pleuritis	+	+	—	—	
216	N. M., w.	27	Rechts oben $\frac{1}{8}$ , linksseitige Pleuritis	+	+	+	+	
217	N. I., w.	39	Rechts oben $\frac{1}{2}$ , links oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
218	H. S., m.	26	Links oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
219	H. D., w.	21	Linksseitige Pleuritis	+	+	—	—	
220	H. I., m.	35	Rechts oben $\frac{2}{3}$ , links oben $\frac{1}{3}$	—	+	+	+	Nochmalige Untersuchung war unmöglich
221	N. S., m.	16	Rechtsseitige Pleuritis	+	+	—	—	
222	M. T., m.	34	Rechtsseitige Pleuritis, rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
223	S. I., m.	35	Linke Lunge ganz, rechts oben $\frac{2}{3}$	+	—	+	+	tot
224	S. D., m.	29	Rechts oben $\frac{2}{3}$	+	+	+	+	
225	S. M., w.	25	Linksseitige Pleuritis	+	+	—	—	
226	Y. M., m.	33	Beide Lungen ganz	+	—	+	+	tot
227	K. D., m.	31	Linke Lunge ganz	+	—	+	+	tot
228	N. O., w.	33	Rechte Spitze	+	+	—	—	
229	M. T., w.	28	Rechte Spitze	+	+	—	—	
230	K. S., m.	49	Links oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
231	K. R., m.	40	Rechtsseitige Pleuritis	+	+	—	—	
232	S. D., w.	18	Linksseitige Pleuritis	+	+	—	—	
233	S. D., m.	16	Rechte Spitze	+	+	—	—	
234	M. D., m.	32	Rechts oben $\frac{1}{2}$	+	+	+	—	
235	Y. D., m.	63	Links oben $\frac{2}{3}$ , rechte Spitze	+	+	+	—	
236	Y. T., m.	34	Links oben $\frac{1}{3}$ , rechtsseitige Pleuritis	+	+	—	—	
237	H. S., m.	20	Links oben $\frac{1}{3}$ , linksseitige Pleuritis	+	+	—	—	
238	T. R., m.	27	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	—	—	
239	Y. W., m.	51	Rechte Lunge ganz, linkss. Bronchit.	+	—	+	—	tot
240	W. B., m.	25	Rechts oben $\frac{2}{3}$ , linke Spitze	+	+	+	+	
241	A. T., w.	22	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linksseitige Pleuritis	+	+	+	—	
242	I. K., m.	20	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
243	T. C., m.	25	Linke Lunge ganz, Darm	+	+	+	+	
244	T. Y., w.	22	Rechts oben $\frac{2}{3}$ , linksseitige Pleuritis	+	—	+	—	Wurde bald schlechter und starb
245	T. T., m.	21	Rechts oben $\frac{2}{3}$ , linke Spitze	+	+	—	—	
246	F. W., w.	24	Linke Lunge ganz, rechts oben $\frac{1}{3}$	+	—	+	+	
247	N. R., m.	30	Links oben $\frac{1}{3}$ , rechte Spitze	+	+	—	—	
248	S. I., m.	31	Linke Spitze	+	+	—	—	
249	N. K., m.	25	Rechts oben $\frac{2}{3}$ , linke Spitze	+	+	+	—	
250	K. N., w.	28	Rechte Lunge ganz, linke Spitze	+	—	+	—	Hohes Fieber, Dyskrasie



Lfd. No.	Name und Geschlecht	Lebensalter	Lokale Erkrankung	TB. im Blut	Pirquet'sche Reaktion	TB. im Sputum	TB. in den Faeces	Bemerkungen
251	Y. M., w.	21	Rechts oben $\frac{2}{3}$ , linke Spitze	+	+	+	+	
252	M. D., m.	29	Rechts oben $\frac{2}{3}$	+	+	+	+	
253	Y. G., w.	30	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , rechtsseit. Pleuritis	+	+	+	+	
254	A. N., m.	54	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linksseitige Pleuritis	+	+	+	+	Starb 11 Monate später
255	I. Y., w.	41	Rechte Lunge ganz, Darm	+	+	+	+	
256	T. K., m.	33	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linksseitige Pleuritis	+	+	+	+	
257	H. S., w.	46	Links oben $\frac{1}{3}$ , linksseitige Pleuritis	+	+	+	+	
258	Y. M., w.	28	Linke Lunge ganz	+	+	+	+	
259	M. R., m.	25	Rechte Lunge ganz, links oben $\frac{2}{3}$ , Darm	+	+	+	+	Starb 4 Monate später
260	M. M., m.	40	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	+	
261	K. W., m.	24	Linke Lunge ganz	+	+	+	+	
262	O. S., m.	27	Rechts oben $\frac{2}{3}$ , linksseitige Pleuritis	+	+	+	+	
263	M. G., m.	21	Rechts oben $\frac{2}{3}$	+	+	+	+	
264	T. T., m.	28	Rechts u. links oben $\frac{2}{3}$ , linksseitige Pleuritis	+	+	+	+	
265	T. B., m.	37	Links oben $\frac{2}{3}$ , rechtsseitige Pleuritis	+	+	+	+	
266	D. Y., w.	22	Rechts oben $\frac{2}{3}$ , rechtsseit. Pleuritis	+	+	+	+	
267	S. Y., m.	27	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , rechtsseit. Pleuritis	+	+	+	+	
268	W. M., m.	19	Rechts oben $\frac{2}{3}$ , linke Spitze	+	+	+	+	Hämopt., starke Anämie, tot
269	O. V., m.	23	Rechts oben $\frac{2}{3}$	+	+	+	+	
270	N. D., w.	25	Linke Spitze	+	+	+	+	
271	H. W., m.	21	Beide Lungen oben $\frac{1}{3}$ , beiders. Pleurit.	+	+	+	+	
272	M. T., m.	12	Linke Lunge ganz, rechte Spitze	+	+	+	+	
273	I. S., m.	18	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , rechtsseit. Pleuritis	+	+	+	+	
274	T. K., w.	19	Links oben $\frac{2}{3}$ , beiderseitige Pleuritis	+	+	+	+	starb
275	N. R., w.	38	Rechts oben $\frac{2}{3}$ , linksseitige Pleuritis	+	+	+	+	Hohes Fieber, Dyskrasie
276	Y. D., m.	26	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , rechtsseit. Pleuritis	+	+	+	+	
277	H. S., m.	25	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	+	
278	Y. D., m.	23	Rechtsseitige Pleuritis	+	+	+	+	
279	U. M., w.	39	Linke Lunge ganz	+	+	+	+	
280	H. M., w.	34	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	+	
281	Y. W., m.	25	Rechte Lunge ganz, linkss. Pleuritis	+	+	+	+	starb
282	Y. D., m.	23	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , rechtsseit. Pleuritis	+	+	+	+	
283	S. C., m.	20	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	+	
284	S. F., m.	19	Rechts oben $\frac{2}{3}$ , links oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	+	
285	M. Y., m.	24	Rechts oben $\frac{2}{3}$ , links oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	+	starb
286	O. K., m.	21	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	+	
287	Y. T., m.	36	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	+	
288	M. R., m.	17	Beide Spitzen, rechtsseitige Pleuritis	+	+	+	+	
289	M. K., w.	28	Linke Spitze	+	+	+	+	
290	U. S., m.	22	Rechte Spitze, rechtsseitige Pleuritis	+	+	+	+	
291	O. N., w.	22	Links oben $\frac{1}{3}$ , Larynx, Darm	+	+	+	+	Diarrhöe, Dyskrasie
292	N. K., m.	27	Rechts oben $\frac{1}{2}$ linke Spitze	+	+	+	+	
293	Y. T., w.	38	Links oben $\frac{2}{3}$	+	+	+	+	
294	A. K., m.	36	Linksseitige Pleuritis	+	+	+	+	
295	N. K., m.	54	Beide Spitzen	+	+	+	+	
296	S. C., m.	23	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	+	Nochmalige Untersuchung war unmöglich
297	S. S., m.	42	Beide Spitzen, Darm	+	+	+	+	
298	M. T., m.	23	Rechte Spitze	+	+	+	+	
299	M. D., m.	21	Rechte Spitze	+	+	+	+	
300	I. Y., m.	32	Beide Lungen oben $\frac{1}{3}$ , rechtss. Pleur.	+	+	+	+	
301	K. D., w.	19	Rechte Spitze	+	+	+	+	

Lfd. No.	Name und Geschlecht	Lebensalter	Lokale Erkrankung	TB. im Blut	Pirquetsche Reaktion	TB. im Sputum	TB. in den Faeces	Bemerkungen
302	K. Y., w.	32	Rechte Spitze	+	+	—	—	
303	O. K., m.	46	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linke Spitze, rechtsseitige Pleuritis	+	+	+	—	
304	A. I., w.	23	Beiderseitige Pleuritis, Peritonitis	+	+	—	—	
305	N. O., w.	36	Links oben $\frac{1}{2}$	+	+	+	+	
306	H. S., m.	34	Rechts oben $\frac{1}{2}$ , linke Spitze	+	+	+	—	
307	G. R., m.	18	Linksseitige Pleuritis, Peritonitis	+	+	—	—	
308	J. N., m.	16	Linke Spitze, Peritonitis, Darm	+	+	—	+	
309	N. M., m.	16	Linke Lunge ganz, rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	+	
310	K. R., w.	47	Darm	+	+	—	+	
311	N. D., w.	22	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
312	N. K., m.	21	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linke Spitze	+	+	+	/	
313	K. R., m.	46	Links oben $\frac{1}{3}$	+	+	—	—	
314	T. D., m.	20	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , rechtsseit. Pleuritis linke Spitze	+	+	—	/	
315	O. N., m.	19	Rechte Spitze	+	+	—	/	
316	M. M., m.	42	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , links schwach	+	+	+	/	
317	M. M., m.	42	Rechte Spitze, linksseitige Pleuritis	+	+	—	—	
318	K. D., m.	51	Linke Lunge ganz, rechts oben $\frac{1}{3}$	+	—	+	/	Hohes Fieber, Dyskrasie
319	Y. D., w.	35	Rechte Spitze	+	+	+	/	
320	K. D., m.	22	Rechte Lunge ganz, linke Spitze, Darm	+	+	+	+	starb
321	S. N., m.	34	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , Peritonitis	+	+	+	/	
322	U. N., m.	27	Rechte Spitze	+	+	—	—	
323	H. T., m.	24	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
324	U. M., m.	22	Rechte Spitze	+	+	—	—	
325	T. T., m.	30	Beide oben $\frac{1}{2}$	+	+	+	—	
326	S. N., m.	36	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
327	F. T., w.	16	Rechts oben $\frac{1}{2}$ , Darm	+	+	+	+	
328	M. T., m.	23	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	—	—	
329	K. T., w.	34	Rechte Spitze	+	+	—	—	
330	M. O., m.	27	Rechts oben $\frac{1}{2}$	+	+	—	—	
331	H. W., m.	23	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linksseitige Pleuritis	+	+	+	—	
332	T. K., w.	29	Rechte Spitze	+	+	—	—	
333	K. N., m.	20	Rechts oben $\frac{2}{3}$ , Darm	+	—	+	+	Schwere Dyskr.
334	Y. D., w.	20	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linke Lunge ganz	+	+	+	—	
335	H. M., m.	32	Rechte Spitze	+	+	—	—	
336	S. N., m.	26	Linke Spitze	+	+	—	/	
337	H. T., m.	28	Beide Spitzen, rechtsseitige Pleuritis	+	+	+	/	
338	H. T., m.	52	Rechts oben $\frac{1}{2}$	+	+	+	/	
339	M. T., m.	27	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linksseitige Pleuritis	+	+	+	/	
340	Y. D., w.	45	Links oben schwach	+	+	—	/	
341	M. T., w.	28	Links oben schwach, linkss. Pleuritis	+	+	—	—	
342	Y. D., m.	42	Rechts unten $\frac{1}{2}$	+	+	+	—	
343	Y. Y., m.	38	Rechte Spitze	+	+	+	/	
344	S. R., w.	26	Linke Spitze, linksseitige Pleuritis	+	+	—	—	
345	M. T., w.	25	Linke Spitze, linksseitige Pleuritis	+	+	+	—	
346	S. K., m.	35	Rechts oben $\frac{1}{2}$ , linke Spitze	+	+	—	—	
347	T. C., w.	19	Linke Lunge ganz, rechte Spitze	+	—	+	—	
348	M. N., m.	32	Links oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
349	K. T., w.	28	Rechte Spitze, beiderseitige Pleuritis	+	+	+	—	
350	D. S., w.	23	Linke Lunge ganz, rechtss. Pleuritis	+	+	+	+	
351	M. T., m.	23	Rechts oben $\frac{1}{2}$	+	+	—	—	
352	O. R., m.	42	Linke Lunge ganz, rechts oben $\frac{1}{3}$ , Darm	+	—	+	+	Hohes Fieber, Dyskrasie, tot
353	S. D., m.	27	Bronchitis	+	+	—	—	
354	O. S., m.	23	Linke Lunge ganz, rechte Spitze	+	+	+	+	

Lfd. No.	Name und Geschlecht	Lebensalter	Lokale Erkrankung	TB. im Blut	Pirquet'sche Reaktion	TB. im Sputum	TB. in den Faeces	Bemerkungen
355	N. R., m.	28	Rechte Lunge ganz, linkss. Pleuritis	+	+	+	—	
356	F. R., m.	29	Links oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
357	K. K., m.	32	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
358	O. B., m.	49	Rechte Lunge ganz, links oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
359	T. D., m.	20	Beide Spitzen	+	+	—	—	
360	T. K., m.	25	Rechts hinten unten	+	+	—	—	
361	N. R., m.	39	Links oben $\frac{1}{3}$	+	+	—	—	
362	Y. G., w.	45	Rechte Spitze	+	+	+	—	
363	K. R., m.	19	Links oben $\frac{1}{3}$ , rechte Spitze	+	+	+	—	
364	K. Y., m.	41	Linke Lunge ganz, rechts oben $\frac{1}{3}$	—	+	+	—	Nochmalige Untersuchung war unmöglich
365	A. R., w.	23	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , rechtsseitige Pleuritis	+	+	+	—	
366	T. R., m.	22	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linke Lunge ganz, linksseitige Pleuritis	+	—	+	—	Schwere Dyskr.
367	K. D., m.	25	Linke Spitze, rechtsseitige Pleuritis	+	+	—	—	
368	K. S., m.	19	Rechts u. links $\frac{1}{3}$ , rechts. Pleuritis	+	+	+	—	
369	K. T., w.	32	Links oben $\frac{1}{3}$	+	+	—	—	
370	U. R., w.	19	Links oben $\frac{1}{3}$ , rechts oben $\frac{1}{3}$ , rechtsseitige Pleuritis	+	+	+	—	
371	Y. D., m.	24	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
372	S. D., m.	28	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , rechtsseitige Pleuritis, Darm	+	+	+	+	
373	K. N., w.	18	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	+	
374	N. S., m.	27	Rechte Spitze	+	+	—	—	
375	S. T., m.	33	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , rechtsseit. Pleuritis	+	+	—	—	
376	N. T., m.	17	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , linksseit. Bronchitis	+	+	+	—	
377	I. Y., m.	38	Beide Lungen ganz	+	—	+	+	Hohes Fieber, Dyskrasie
378	T. R., m.	37	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
379	F. T., w.	35	Rechter Oberlappen	+	+	+	—	
380	M. N., m.	17	Rechter Oberlappen	+	+	—	—	
381	I. T., w.	21	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , rechtsseit. Pleuritis	+	+	—	—	
382	M. T., m.	23	Rechte Spitze	+	+	—	—	
383	M. R., m.	20	Beide Spitzen	+	+	—	—	
384	N. O., m.	22	Rechte Spitze	+	—	+	—	
385	I. N., m.	20	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , Darm	+	+	+	+	
386	H. N., m.	25	Linke Spitze	+	+	—	—	
387	O. Y., w.	58	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , rechtsseitige Pleuritis	+	+	—	—	
388	N. D., w.	27	Rechte Spitze, beiderseitige Pleuritis	+	+	—	—	
389	S. N., m.	19	Rechtsseitige Pleuritis	+	+	—	—	
390	J. T., m.	40	Rechter Oberlappen, rechts. Pleuritis	+	+	—	—	
391	J. T., m.	28	Rechts oben $\frac{1}{3}$ , rechtsseit. Pleuritis, linke Spitze.	+	+	+	—	
392	M. M., w.	30	Links oben $\frac{1}{3}$ , rechte Spitze	+	+	+	—	
393	I. D., w.	23	Beide Spitzen	+	+	—	—	
394	M. Y., m.	27	Rechte Spitze	+	+	—	—	
395	O. T., m.	27	Rechte Spitze	+	+	—	—	
396	N. N., m.	32	Rechtsseitige Pleuritis	+	+	+	—	
397	Y. D., w.	35	Beide Spitzen	+	+	—	—	
398	M. R., m.	35	Rechte Spitze	+	+	—	—	
399	M. B., w.	37	Rechte Lunge ganz, Darm	+	—	+	—	Hohes Fieber, Dyskrasie
400	T. K., w.	29	Rechter Oberlappen, rechts. Pleuritis	+	+	—	—	
401	N. T., m.	38	Rechter Oberlappen, beiders. Pleuritis	+	+	—	—	
402	M. D., m.	49	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	—	—	
403	U. D., m.	33	Rechte Spitze	+	+	—	—	
404	Y. I., m.	50	Rechte Spitze	+	+	—	—	



Lfd. No.	Name und Geschlecht	Lebensalter	Lokale Erkrankung	TB. im Blut	Pirquetsche Reaktion	TB. im Sputum	TB. in den Faeces	Bemerkungen
405	Y. D., w.	33	Rechte Lunge ganz	+	+	+	—	
406	Y. W., m.	25	Rechte Spitze, linksseitige Pleuritis	+	+	—	—	
407	F. I., w.	54	Rechte Lunge ganz, linke Spitze	+	+	—	—	
408	S. M., w.	25	Rechte Lunge ganz, linke Spitze	+	—	+	—	Starke Anämie
409	I. Y., m.	38	Rechtsseitige Pleuritis	+	+	—	—	
410	T. K., w.	22	Beide Spitzen	+	+	—	—	
411	S. N., m.	28	Linker Oberlappen, linkss. Pleuritis	+	+	—	—	
412	A. N., w.	22	Rechter Oberlappen	+	+	—	—	
413	N. I., w.	28	Links oben $\frac{1}{3}$	+	+	—	—	
414	S. K., m.	41	Rechte Spitze	+	+	—	—	
415	U. D., m.	33	Rechte Spitze	+	+	—	—	
416	H. T., w.	31	Rechter Oberlappen, rechtss. Pleuritis	+	+	—	—	
417	F. I., m.	36	Linke Lunge ganz, rechts oben $\frac{1}{3}$	+	—	+	—	Hohes Fieber, schwere Dyskr.
418	J. Y., m.	36	Rechtsseitige Pleuritis	+	+	—	—	
419	Y. D., m.	39	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	—	—	
420	M. S., m.	26	Rechter Oberlappen	+	+	—	—	
421	Y. N., m.	20	Rechter Oberlappen, rechtss. Pleuritis	+	+	—	—	
422	Y. D., m.	18	Rechte Spitze, rechtsseitige Pleuritis	+	+	+	—	
423	H. M., m.	23	Rechter Oberlappen	+	+	—	—	
424	M. I., m.	26	Linke Lunge ganz, rechte Spitze	+	+	—	—	
425	M. D., m.	30	Rechte Spitze	+	+	—	—	
426	I. D., w.	22	Linker Oberlappen, rechte Spitze	+	+	—	—	
427	M. Y., w.	22	Linke Spitze	+	+	—	—	
428	M. S., m.	27	Linke Spitze	+	+	—	—	
429	T. N., w.	37	Linke Spitze	+	+	+	—	
430	T. M., m.	31	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	+	—	
431	M. T., w.	32	Rechte Lunge ganz, links oben $\frac{1}{2}$	+	+	+	—	
432	T. D., m.	25	Beide Lungen ganz	+	+	+	+	
433	H. M., m.	26	Rechte Lunge ganz	+	+	+	+	
434	Y. R., m.	29	Rechte Spitze, linke Lunge ganz	+	+	+	—	
435	I. T., w.	36	Rechte Lunge ganz	+	+	+	—	
436	M. Y., m.	30	Rechte Spitze	+	+	+	—	
437	O. T., m.	22	Rechte und linke Spitze schwach	+	+	—	—	
438	H. I., w.	29	Rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	—	—	
439	H. Y., w.	28	Linke Spitze	+	+	—	—	
440	K. M., m.	25	Links oben $\frac{1}{2}$	+	+	+	+	
441	S. Z., m.	22	Links oben schwach, rechts oben $\frac{1}{3}$	+	+	—	—	
442	Y. D., m.	17	Rechts oben schwach, links oben $\frac{1}{3}$	+	+	—	—	
443	H. S., m.	26	Rechte Lunge ganz	+	+	+	+	
444	J. G., m.	24	Rechte Spitze	+	+	—	—	
445	N. G., m.	13	Rechte Lunge ganz, linke Spitze	+	+	+	—	
446	T. K., w.	31	Rechte Spitze	+	+	—	—	
447	S. D., m.	26	Rechtsseitige Pleuritis	+	+	—	—	
448	J. R., m.	18	Beide Spitzen	+	+	—	—	
449	M. N., m.	19	Linke Spitze, rechte Lunge ganz	+	+	+	+	
450	J. C., m.	24	Rechte Lunge ganz	+	+	+	—	
451	K. K., m.	41	Beide Lungen ganz	+	+	+	—	
452	J. C., m.	34	Rechte Spitze	+	+	—	—	
453	W. D., m.	18	Rechte Spitze	+	+	—	—	
454	M. D., m.	23	Linke Spitze	+	+	—	—	
455	M. N., m.	13	Links oben schwach, rechte Spitze, linksseitige Pleuritis	+	+	—	—	
456	M. M., w.	22	Beide Lungen ganz	+	+	+	—	
457	O. Y., w.	20	Linke Spitze	+	+	—	—	
458	O. N., m.	16	Rechte Spitze	+	+	—	—	
459	O. T., m.	32	Links oben $\frac{1}{2}$ , rechte Lunge ganz	+	+	+	—	
460	N. Y., m.	29	Beide Spitzen	+	+	—	—	
461	W. B., w.	33	Linke Spitze	+	+	—	—	
462	S. G., m.	35	Rechtsseitige Pleuritis	+	+	—	—	

Lfd. No.	Name und Geschlecht	Lebensalter	Lokale Erkrankung	TB. im Blut	Pirquetsche Reaktion	TB. im Sputum	TB. in den Faeces	Bemerkungen
463	Y. S., m.	30	Rechts oben $\frac{1}{8}$	+	+	+	—	
464	O. T., m.	21	Rechts oben $\frac{1}{8}$	+	+	—	—	
465	A. R., m.	20	Linke Spitze	+	+	—	—	
466	S. G., w.	34	Beide Spitzen	+	+	—	—	
467	K. M., m.	22	Beide Lungen oben $\frac{1}{8}$	+	+	+	—	
468	M. R., m.	15	Beide Spitzen	+	+	—	—	
469	N. D., m.	20	Beide Spitzen	+	+	—	—	
470	N. K., m.	40	Linke Spitze	+	+	—	—	
471	U. D., m.	16	Rechts oben $\frac{1}{8}$ , linke Spitze, Niere	+	+	+	—	
472	H. T., m.	15	Beide Spitzen	+	+	—	—	
473	J. K., w.	18	Rechts oben $\frac{1}{8}$	+	+	+	—	
474	K. I., m.	35	Rechts oben $\frac{1}{8}$ , linke Lunge ganz	+	+	+	—	
475	U. T., m.	16	Links oben $\frac{1}{8}$	+	+	+	—	
476	M. T., m.	37	Rechts unten $\frac{1}{8}$	+	+	+	—	
477	S. N., m.	18	Beide Spitzen	+	+	—	—	
478	T. D., w.	18	Rechts oben $\frac{1}{8}$ , links oben $\frac{1}{8}$ , rechts-seitige Pleuritis	+	+	+	—	
479	J. S., m.	20	Beide Lungen oben $\frac{1}{8}$	+	+	+	+	
480	M. R., w.	28	Linke Spitze	+	+	—	—	
481	K. R., m.	29	Rechts oben $\frac{1}{8}$ , links oben $\frac{1}{2}$	+	+	+	+	
482	O. T., w.	15	Links oben $\frac{1}{8}$	+	+	+	—	
483	T. M., m.	30	Links oben $\frac{1}{2}$	+	+	+	—	
484	S. M., m.	31	Rechte Lunge ganz	+	+	+	+	
485	U. K., m.	21	Rechts oben $\frac{1}{8}$	+	+	+	+	
486	K. M., m.	27	Links oben $\frac{1}{2}$	+	+	+	—	
487	H. R., m.	25	Linke Spitze, linksseitige Pleuritis	+	+	—	—	
488	N. I., m.	19	Rechte Spitze	+	+	—	—	
489	T. T., m.	29	Beide Lungen ganz	+	+	+	—	
490	M. J., m.	25	Linke Spitze	+	+	—	—	
491	M. R., m.	22	Beide Spitzen	+	+	—	—	
492	O. K., m.	19	Rechts oben $\frac{1}{8}$	+	+	+	—	
493	M. D., w.	29	Beide Lungen ganz	+	—	+	+	Hohes Fieber, Dyskrasie
494	M. T., m.	51	Linke Spitze, rechte Lunge ganz	+	+	+	—	
495	K. C., m.	21	Beide Lungen oben $\frac{1}{8}$	+	+	+	—	
496	T. M., m.	27	Beide Lungen oben $\frac{1}{8}$	+	+	+	+	
497	F. S., m.	40	Linke Lunge ganz, rechts oben $\frac{1}{8}$	+	+	+	+	
498	T. K., m.	35	Rechts oben $\frac{1}{8}$	+	+	+	—	
499	H. M., m.	23	Rechts oben $\frac{1}{8}$	—	+	+	+	Nochmalige Untersuchung war unmöglich
500	T. J., m.	20	Rechte Spitze, Darm	+	+	—	+	
501	J. T., m.	39	Rechte Lunge ganz, linke Spitze	+	+	+	—	
502	T. I., m.	36	Linke Spitze	+	+	—	—	
503	S. N., m.	27	Linke Spitze, rechte Lunge ganz	+	+	+	—	
504	Y. T., m.	22	Rechts oben schwach, links oben $\frac{1}{2}$	+	+	+	—	
505	T. S., m.	33	Links oben $\frac{1}{8}$ , rechts oben schwach	+	+	+	—	
506	K. S., m.	34	Rechte Spitze	+	+	—	—	
507	K. N., m.	21	Linke Lunge ganz, rechts oben $\frac{1}{8}$	+	+	+	—	
508	A. N., w.	20	Beide Lungen ganz	+	—	+	—	Hohes Fieber, Dyskrasie
509	A. T., w.	24	Rechts oben $\frac{1}{8}$ , linke Lunge ganz	+	+	+	—	
510	N. R., w.	41	Rechte Spitze, links oben schwach	+	+	—	—	
511	A. T., m.	30	Rechte Spitze	+	+	—	—	
512	T. S., w.	56	Beide Spitzen	+	+	—	—	
513	S. Y., m.	25	Linke Lunge ganz, rechte Spitze	+	+	+	—	
514	K. R., m.	30	Rechte Spitze	+	+	—	—	
515	T. Y., m.	20	Links oben schwach, linkss. Pleuritis	+	+	—	—	
516	Y. K., m.	26	Rechte Spitze, beiderseitige Pleuritis	+	+	—	—	
517	N. T., w.	46	Rechte Spitze, beiderseitige Pleuritis	+	+	—	—	



Tabelle II.

Gesunde. (Leute, die über keine Krankheitserscheinungen klagten, bei denen man auch keine Symptome nachweisen konnte.)

Lfd. No.	Name und Geschlecht	Lebensalter	Beruf	TB. im Blut	Pirquetsche Reaktion	TB. im Sputum	TB. in den Faeces	Bemerkungen
1	R. T., m.	62	Arbeiter	+	+	-	/	Sein Sohn ist tuberkulös
2	T. D., m.	31	Kutscher	+	+	-	/	
3	O. D., m.	30	Kaufmann	-	-	-	/	
4	S. M., m.	25	Kutscher	+	+	-	/	
5	Y. M., m.	26	Kutscher	-	-	-	/	
6	K. R., w.	26	Bäuerin	-	+	-	/	
7	S. G., m.	16	Diener	-	-	/	/	
8	Y. R., w.	20	Krankenschwester	+	+	-	-	6 Monate später Tuberculosis pulmonum
9	N. N., w.	18	"	+	+	-	-	
10	S. G., w.	18	"	+	+	/	-	
11	K. R., w.	17	"	-	-	/	/	
12	U. R., w.	17	"	-	-	/	/	
13	S. N., w.	16	Studentin	-	-	/	/	
14	Y. Y., m.	28	Student	-	+	-	/	
15	A. B., w.	23	Studentin	-	-	-	-	
16	A. M., w.	19	Krankenschwester	+	+	-	/	4 Monate später Pleuritis
17	M. K., m.	32	Kaufmann	+	+	-	-	Seine Frau ist tuberkulös
18	K. T., m.	20	Kaufmann	-	-	/	/	
19	H. S., w.	33	Kauffrau	+	+	-	-	
20	K. T., w.	34	Bäuerin	+	+	-	-	Ihr Sohn ist tuberkulös
21	H. S., w.	28	Frau eines Malers	+	+	-	-	Ihr Mann ist tuberkulös
22	F. Y., w.	18	Krankenschwester	+	+	-	-	
23	R. T., m.	32	Zimmermann	+	+	-	-	Einige Monate später Affektion links oben
24	S. K., m.	41	Kaufmann	-	-	-	/	
25	H. N., m.	38	Ohne bestimmten Beruf	-	-	-	/	
26	S. Z., m.	24	Student	+	+	/	/	
27	T. Y., m.	30	Ohne bestimmten Beruf	-	-	-	/	
28	S. K., m.	32	Arzt	-	-	/	-	
29	O. R., m.	18	Ohne bestimmten Beruf	-	-	-	/	
31	M. G., w.	28	Ohne bestimmten Beruf	-	-	-	/	
30	T. O., m.	25	Student	-	-	/	/	
32	N. Y., m.	25	Ohne bestimmten Beruf	-	-	/	/	
33	W. D., m.	20	" " "	+	+	-	-	Mit tuberkulösen Kranken zusammen gewesen
34	K. M., m.	18	" " "	+	+	-	-	
35	Y. M., m.	28	Bauer	+	+	-	-	
36	Y. D., m.	58	Ohne bestimmten Beruf	-	-	-	-	
37	Y. M., m.	21	Diener	-	-	-	/	
38	A. G., m.	19	Ohne bestimmten Beruf	-	+	-	/	
39	O. D., m.	18	Ohne bestimmten Beruf	-	-	/	/	
40	O. W., w.	26	Krankenschwester	+	+	-	-	
41	K. S., w.	26	"	-	-	-	/	
42	T. N., w.	16	"	+	+	-	/	
43	K. T., w.	18	"	+	+	-	-	
44	O. M., m.	30	Kutscher	+	+	/	-	

Lfd. No.	Name und Geschlecht	Lebensalter	Beruf	TB. im Blut	Pirquetsche Reaktion	TB. im Sputum	TB. in den Faeces	Bemerkungen
45	D. R., m.	25	Arbeiter	—	—	/	—	
46	K. W., m.	41	Arbeiter	—	—	/	/	
47	Y. T., m.	33	Ohne bestimmten Beruf	+	+	—	/	8 Monate später Affektion der linken Spitze
48	O. C., m.	27	Diener	+	+	—	/	
49	Y. S., m.	18	Arbeiter	+	+	/	—	
50	O. B., m.	43	Bauer	—	—	/	—	
51	T. K., m.	28	Ohne bestimmten Beruf	+	+	—	—	
52	T. S., w.	37	Ohne bestimmten Beruf	+	+	/	/	11 Monate später Pleuritis
53	K. G., m.	45	Diener	+	+	—	/	
54	H. D., w.	20	Krankenschwester	+	+	—	—	4 Monate später Peritonitis

Tabelle III.  
Zusammenstellung.

	TB. im Blut	Pirquetsche Reaktion	TB. im Sputum	TB. in den Faeces	Summe
1	+	+	+	—	169
2	+	+	—	—	245
3	+	+	—	+	4
4	+	+	+	+	53
5	+	—	+	—	16) 38
6	—	+	+	—	22) 7
7	—	—	—	—	1

Total 517

### Zusammenfassung.

1) Durch obige Untersuchungen ist es uns gelungen, nachzuweisen, daß diejenigen Fälle, bei denen die v. Pirquetsche Reaktion positiv ausfiel, auch fast immer Tuberkelbacillen im Blut zeigten.

2) Deswegen können wir sagen, daß diejenigen Patienten, bei denen die v. Pirquetsche Reaktion positiv ausfällt, irgendwo mit den Tuberkelbacillen infiziert sind.

3) Es ist noch die Frage, ob diese Personen als tuberkulöse Kranke behandelt werden sollen oder nicht, da sie, wie sich in Tabelle II zeigt, trotz der Tuberkelbacillen im Blut noch ebenso wie gesunde Menschen arbeiten können und auch keine weiteren tuberkulösen Symptome erkennen lassen.

4) Findet man die v. Pirquetsche Reaktion an zweifelhaften Kranken positiv, dann kann man sagen, daß die betreffenden Kranken tuberkulös sind.

5) Man kann noch nicht sicher sagen, daß der opsoninische Index derjenigen Patienten, deren Blut Tuberkelbacillen enthält, die aber noch

gut arbeiten können und keine Krankheitserscheinungen darbieten, immer höher ist als bei Normalen, weil unsere Erfahrungen auf diesem Gebiete noch nicht groß genug sind.

Wir können unsere Arbeit nicht schließen, ohne Herrn Dr. Ishigami, dem Direktor des Instituts, für die liebenswürdige Unterstützung bei unseren Studien, und den Herren Kollegen Dr. Akahoshi, Dr. Imai und Dr. Kitahara für die freundliche Hilfe bei unserer Arbeit unseren besten Dank auszusprechen.

#### Literatur.

- 1) Burkhardt, Ueber Häufigkeit und Ursache menschlicher Tuberkulose auf Grund von ca. 1400 Sektionen. (Zeitschr. f. Hyg. 1906.)
- 2) Mantoux und Roux, Intradermo-Tuberkulinreaktion. (Acad. des Scienc.; Ref. Münch. med. Wochenschr. 1908.)
- 3) Nägeli, Ueber Häufigkeit, Lokalisation und Ausheilung der Tuberkulose. (Virch. Arch. 1900.)
- 4) v. Pirquet, Demonstrationen zur Tuberkulindiagnose durch Hautimpfung. (Berlin. klin. Wochenschr. 1907.)
- 5) —, Der diagnostische Wert der kutanen Tuberkulinreaktion bei der Tuberkulose des Kindesalters auf Grund von 100 Sektionen. (Wien. klin. Wochenschr. 1907.)
- 6) —, Die kutane Tuberkulinprobe. (Verhandl. d. 24. Versamml. d. Gesellsch. f. Kinderheilk. Dresden 1907.)
- 7) —, Kutane und konjunktivale Tuberkulinreaktion. (Handb. d. Technik u. Methode d. Immunitätsforsch.)
- 8) —, Die kutane Tuberkulinreaktion. (Tuberkulosis. 1908.)
- 9) Wolff-Eisner, Die differenzierenden Kutan-Tuberkulinreaktionen. (Wien. klin. Wochenschr. 1908.)
- 10) Schnitzer, Nachweis und Bedeutung der Tuberkelbacillen im strömenden Phthisikerblut. (Dtsch. med. Wochenschr. 1909.)
- 11) Lippmann, Zum Nachweise der Tuberkelbacillen im strömenden Blut der Phthisiker. (Münch. med. Wochenschr. 1909.)
- 12) Jessen und Rabinowitsch, Ueber das Vorkommen von Tuberkelbacillen im kreisenden Blute und die praktische Bedeutung dieser Erscheinung. (Dtsch. med. Wochenschr. 1910.)
- 13) Moro, Ueber eine diagnostisch verwertbare Reaktion der Haut auf Einreibung von Tuberkulinsalbe. (Münch. med. Wochenschr. 1908.)
- 14) Stäubli, Beitrag zum Nachweis von Parasiten im Blut. (Münch. med. Wochenschrift 1908.)
- 15) Rosenberger, The presence of tubercle bacilli in the circulating blood in tuberculosis. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. 50. 1909.)
- 16) Saathoff, Tuberkulindiagnostik und Therapie nebst Stoffwechselversuchen bei der Tuberkulinreaktion. (Münch. med. Wochenschr. 1909.)
- 17) Much, Ueber die granuläre, nach Ziel nicht färbbare Form des Tuberkulosevirus. (Beitr. z. Klin. d. Tuberkulose. Bd. 8. 1907.)
- 18) Hermann, Sur la coloration du bacilli tuberculeux. (Ann. de l'inst. Past. T. 22. 1908.)
- 19) Gasis, Ueber eine neue Reaktion der Tuberkelbacillen und eine darauf begründete differentialdiagnostische Färbungsmethode derselben. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. 50. 1909.)
- 20) Calmette, Breton, et Petit, Étude expérimentale de l'ophtalmoréaction à la tuberculine. (Compt. rend. hebdom. de la Soc. de Biol. T. 63. 1907.)

*Nachdruck verboten.*

## Ueber den Nachweis der Typhusbacillen im Wasser mittels Komplementablenkung.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Graz (Vorstand: Prof. Dr. W. Prausnitz).]

Von Ra. Med. et phil. Dr. **Karl Bösler.**

Volpino und Cler empfehlen in ihrer im April l. J. erschienenen Arbeit „Die Untersuchung der Wässer auf Typhusbacillen mit dem Komplementfixierungsverfahren“, zum Nachweise der Typhusbacillen die Komplementablenkung zu verwenden.

Sie raten zu dieser Methode als sicher und bequem, um minimalste Verunreinigungen des Wassers durch Typhusbacillen nachweisen zu können.

Ausgehend von einer Normalöse, welche in 100 ccm physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt wurde, wird festgestellt, daß 2 Tropfen des verwendeten Typhusimmunserums imstande waren, mittels der Komplementablenkung 0,1 ccm dieser Typhusaufschwemmung ( $= \frac{1}{1000}$  Oese) nachzuweisen.

Dieser Vorversuch wurde hierauf auf das praktische Gebiet übertragen, indem 10 l Wasser mit 0,2 mg ( $= \frac{1}{10}$  Oese) Typhusbacillen versetzt wurden.

Zur Untersuchung wurden diese 10 l eingedampft und zwar bei dem einen Versuche auf dem Wasserbade bei 100° C, bei einem zweiten im Vakuum bei 40°; bei dem dritten geschah die Einengung durch Filtration durch eine Chamberlandsche F-Kerze.

Bei allen drei Versuchsanordnungen wurden die 10 l auf ca. 100 ccm eingeeengt und diese dann der Untersuchung unterworfen.

Die Resultate waren bei allen diesen Versuchen fast übereinstimmend mit dem Vorversuche, daß also 0,2 ccm ( $= \frac{1}{5000}$  Oese) des Rückstandes mit 2 Tropfen Immunserum noch Ablenkung des Komplementes ergaben.

Der Nachweis der den 10 l zugesetzten Bacillenmenge auf der Drigalski-Platte fiel für 1 ccm und 0,5 ccm negativ aus.

Für diese Versuche wurde je eine Normalöse verwendet. Nach Rubner sind in 1 mg frischer Bakteriensubstanz rund 61 Mill. Individuen (*Proteus*) enthalten, in einer Normalöse also ca. 122 Mill. Keime; in diesen 10 l mit Typhusbacillen infiziertem Wasser würden nach diesen Berechnungen 12 Mill., in 1 ccm also ca. 1000 Keime enthalten sein, von denen nach Hehewerths Berechnungen ca. 88 Proz., also 880, noch lebend sind, welche auf der Drigalski-Platte sich nicht mehr, wohl aber durch die Komplementablenkung nachweisen lassen sollen.

Während also Volpino und Cler mit der Komplementablenkung äußerst günstige Resultate erzielten, stellte im Gegensatz dazu Moreschi fest, daß durch die Komplementablenkungsmethode sich kleine Mengen von Typhusbakterien nicht nachweisen lassen, denn nach seinen Versuchen gab  $\frac{1}{1000}$  und  $\frac{1}{100}$  Oese mit Immunserum (0,01) noch vollständige Hämolyse, und erst bei ca.  $\frac{1}{12}$  Oese trat Hemmung ein.

Zur Nachprüfung obiger Resultate wurde derselbe Weg eingeschlagen, den Volpino und Cler in ihren Versuchen betreten hatten.

Das verwendete Typhusimmunserum mit dem Agglutinationstiter 1 : 40960 fixierte von 0,65 ccm an das Komplement. Die Kombination



der Bacillenaufschwemmung mit Immunserum wurde ebenso wie in der angeführten Arbeit durchgeführt, nur mit dem Unterschiede, daß vom Immunserum sowie Komplement je 0,1 ccm verwendet wurde.

Es wurden 3 Reihen von Versuchen angestellt, und zwar 1) mit der 3-fach lösenden Ambozeptordosis, 2) mit der 1½-fachen und 3) mit der einfachen. Für alle Versuche, die stets mindestens zweimal durchgeführt wurden, wurde ein nach Much mit Glyzerin konservierter Hammelblutambozeptor genommen, der seit fast 2 Monaten seinen Titer (0,6 ccm der 1000-fachen Verdünnung bei 1 ccm 5-proz. Hammelblutkörperchenaufschwemmung) unverändert behalten hatte.

Tabelle I.  
1 Oese auf 100 ccm NaCl.

Typhus- serum	Antigen	Kom- plement	5-proz. Hammel- blut	Ambo- zeptor 100mal verdünnt	Resultat	Kontrolle	
						Antigen + häm. System	Resultat
0,1	0,1	0,1	1,0	0,2	++	0,1	+++
0,1	0,2	0,1	1,0	0,2	++	0,2	+++
0,1	0,3	0,1	1,0	0,2	++	0,3	+++
0,1	0,4	0,1	1,0	0,2	++	0,4	+++
0,1	0,5	0,1	1,0	0,2	++	0,5	+++

+++ vollständige Hämolyse, ++ fast vollständige Hämolyse, --- vollständige Ablenkung.

Tabelle II.  
1 Oese auf 10 ccm NaCl.

Typhus- serum	Antigen	Kom- plement	5-proz. Hammel- blut	Ambo- zeptor 100mal verdünnt	Resultat	Kontrolle	
						Antigen + häm. System	Resultat
0,1	0,1	0,1	1,0	0,2	++	0,1	++
0,1	0,2	0,1	1,0	0,2	++	0,2	+
0,1	0,3	0,1	1,0	0,2	++	0,3	—
0,1	0,4	0,1	1,0	0,2	++	0,4	—
0,1	0,5	0,1	1,0	0,2	++	0,5	—

Tabelle III.  
1 Oese auf 100 ccm NaCl.

Typhus- serum	Antigen	Kom- plement	5-proz. Hammel- blut	Ambo- zeptor 100mal verdünnt	Resultat	Kontrolle	
						Antigen + häm. System	Resultat
0,1	0,1	0,1	1,0	0,1	+	0,1	+++
0,1	0,2	0,1	1,0	0,1	+	0,2	+++
0,1	0,3	0,1	1,0	0,1	+	0,3	+++
0,1	0,4	0,1	1,0	0,1	+	0,4	+++
0,1	0,5	0,1	1,0	0,1	++	0,5	+++
0,1	0,6	0,1	1,0	0,1	++	0,6	+++
0,1	0,7	0,1	1,0	0,1	++	0,7	+++
0,1	0,8	0,1	1,0	0,1	++	0,8	+++
0,1	0,9	0,1	1,0	0,1	++	0,9	+++
0,1	1,0	0,1	1,0	0,1	++	1,0	+++

Tabelle IV.  
1 Oese auf 100 ccm NaCl.

Typhus- serum	Antigen	Kom- plement	5-proz. Hammel- blut	Ambo- zeptor 500mal verdünnt	Resultat	Kontrolle	
						Antigen + häm. System	Resultat
0,1	0,1	0,1	1,0	0,3	++	0,1	+++
0,1	0,2	0,1	1,0	0,3	++	0,2	+++
0,1	0,3	0,1	1,0	0,3	++	0,3	+++
0,1	0,4	0,1	1,0	0,3	++	0,4	+++
0,1	0,5	0,1	1,0	0,3	++	0,5	+++
0,1	0,6	0,1	1,0	0,3	++	0,6	+++
0,1	0,7	0,1	1,0	0,3	++	0,7	+++
0,1	0,8	0,1	1,0	0,3	++	0,8	+++
0,1	0,9	0,1	1,0	0,3	++	0,9	+++
0,1	1,0	0,1	1,0	0,3	++	1,0	+++

Tabelle V.  
1 Oese auf 10 ccm NaCl.

Typhus- serum	Antigen	Kom- plement	5-proz. Hammel- blut	Ambo- zeptor 100mal verdünnt	Resultat	Kontrolle	
						Antigen + häm. System	Resultat
0,1	0,1	0,1	1,0	0,1	++	0,1	+++
0,1	0,2	0,1	1,0	0,1	++	0,2	+++
0,1	0,3	0,1	1,0	0,1	++	0,3	+++
0,1	0,4	0,1	1,0	0,1	++	0,4	+++
0,1	0,5	0,1	1,0	0,1	++	0,5	+++
0,1	0,6	0,1	1,0	0,1	++	0,6	+++
0,1	0,7	0,1	1,0	0,1	++	0,7	+++
0,1	0,8	0,1	1,0	0,1	++	0,8	+++
0,1	0,9	0,1	1,0	0,1	++	0,9	+++
0,1	1,0	0,1	1,0	0,1	++	1,0	+++

Tabelle VI.  
1 Oese auf 10 ccm NaCl.

Typhus- serum	Antigen	Kom- plement	5-proz. Hammel- blut	Ambo- zeptor 500mal verdünnt	Resultat	Kontrolle	
						Antigen + häm. System	Resultat
0,1	0,1	0,1	1,0	0,3	— — —	0,1	+++
0,1	0,2	0,1	1,0	0,3	— — —	0,2	+++
0,1	0,3	0,1	1,0	0,3	— — —	0,3	+++
0,1	0,4	0,1	1,0	0,3	— — —	0,4	+++
0,1	0,5	0,1	1,0	0,3	— — —	0,5	+++
0,1	0,6	0,1	1,0	0,3	— — —	0,6	+++
0,1	0,7	0,1	1,0	0,3	— — —	0,7	+++
0,1	0,8	0,1	1,0	0,3	— — —	0,8	+++
0,1	0,9	0,1	1,0	0,3	— — —	0,9	+++
0,1	1,0	0,1	1,0	0,3	— — —	1,0	+++

Aus den aufgeführten 6 Tabellen geht hervor:

1) Die verwendeten Bakterienaufschwemmungen an und für sich hemmten in Dosen von  $\frac{3}{100}$  Oesen aufwärts (Tabelle II).

2) Das Immunserum (hochwertiges) zeigte von 0,65 ccm an bei 3-fach lösender Ambozeptordosis und 1 ccm Hammelblutaufschwemmung Eigenhemmung.

3) Die sicher nachweisbare Dosis des Antigens ging bei dem verwendeten hochwertigen Immunserum (0,1 ccm) nur bis  $\frac{1}{100}$  Oese bei einfacher Ambozeptordosis (Tabelle VI); bei 3-facher und  $1\frac{1}{2}$ -facher Ambozeptordosis zeigte sich überhaupt nur eine undeutliche Ablenkung (Tab. II und V). Was den Nachweis der Bacillenmenge von 1 Oese auf 100 l verdünnt mit Hilfe der Platten anbelangt, so konnte der Befund, daß die Drigalski-Platte diese Mengen nicht mehr nachweist, auch für die Endo-Platte bestätigt werden.

Trotz der negativ ausgefallenen Vorversuche wurden die auf die angegebene Weise infizierten je 10 l Wasser einmal bei 100°, das andere Mal bei 40° bis auf ca. 100 ccm eingengt, mit der entsprechenden Menge NaCl versetzt und untersucht, sowie auch der Rückstand auf einer 20 cm langen Filterkerze System Nordtmayer-Berkefeld.

Der bei 100° C gewonnene Rückstand war leicht getrübt, gelblich. Der im Vakuum bei 40° und 50 cm Manometer abgedampfte Rückstand (4 Tage) war wasserklar.

Zum Durchschicken durch die Filterkerze waren 1 Stunde 20 Minuten notwendig. Der Belag der Kerze wurde mit einem sterilen Platinpinsel abgekratzt und in 100 ccm NaCl aufgeschwemmt. Diese Aufschwemmung war milchig getrübt.

Die mit den 3 Rückständen angestellten Ablenkungsversuche ergaben für 1-,  $1\frac{1}{2}$ - und 3-fache Ambozeptordosen zumeist vollständige oder fast vollständige Hämolyse.

Zusammenfassend lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1) Es konnten Typhusbakterienaufschwemmungen mittels spezifischen Immunserums durch die Komplementablenkung erst in relativ hohen Konzentrationen, in unserem Falle von  $\frac{1}{100}$  Normalöse an bei einfacher Ambozeptordosis nachgewiesen werden.

2) Diese Bakterienaufschwemmungen hemmten von  $\frac{3}{100}$  Normalöse aufwärts selbst ohne Immunserum.

3) Uebereinstimmend mit den Angaben Moreschis erwies sich die Komplementbindung zum Nachweis geringer Mengen von Typhusbacillen als nicht geeignet.

Die Abweichung dieser Resultate von denen der Arbeit Volpino und Clers läßt sich nicht ohne weiteres erklären; vielleicht dürfte die Differenz darin zu suchen sein, daß die beiden Autoren eigens für diesen Zweck hergestellte Immunsera verwendet haben, die andere Qualitäten besaßen.

#### Literatur.

- 1) Volpino und Cler, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 58. p. 392.
- 2) Moreschi, Berl. klin. Wochenschr. Bd. 38. 1906. p. 1248.
- 3) Hehewerth, F. H., Arch. f. Hyg. Bd. 39. p. 321.
- 4) Much, Die Immunitätswissenschaft. Würzburg 1911.
- 5) Rubner, Arch. f. Hyg. Bd. 46. 1903. p. 41.

*Nachdruck verboten.*

## Zum Nachweis der Typhusbacillen im Blut.

Von Prof. **Conradi**, Halle a. S.

Im September 1904 habe ich ein neues Verfahren der Blutkultur in die bakteriologische Typhusdiagnostik einzuführen gesucht. Die damals von mir angewandte Mischung von Krankenblut und doppelter Menge Rindergalle ist die allgemeine Methode geworden. Trotzdem dies feststeht, finden sich in der Literatur ab und zu irrige Angaben. Daher habe ich im Vorjahr (diese Zeitschr. Abt. I. Orig. Bd. 56. Heft 3) nochmals die Urheberschaft des Gallenverfahrens dargelegt und frühere Unterlassungen des Herrn Stabsarzt Kayser berichtigt. Jetzt erst (diese Zeitschr. Bd. 60. Heft 1) stellt sich seine Erwiderung ein. Zur Rechtfertigung sollen Stellen aus seinen und meinen Veröffentlichungen dienen. Indes wird hier zweimal im wörtlichen Zitat der Text verändert, so daß der Sinn entstellt ist<sup>1)</sup>. In der Tat ist seine Position unhaltbar. Es ist nicht zu widerlegen, daß gleich die erste, mein ursprüngliches Verfahren nachprüfende Veröffentlichung Kayzers (Münch. med. Wochenschr. 1906. No. 17) die von mir geförderten praktischen Ergebnisse totschießt. Weder berichtet sie meine zahlreichen Blutbefunde, vergleicht nicht seine und meine Resultate, noch erwähnt sie, daß ich von vornherein die Blutkultur für die Frühdiagnose des Typhus angegeben habe. So gab sich der Autor eine wirksamere Folie, putzte und schmückte sich, indem er mir wohl das Prinzip des Verfahrens, nicht aber die Nutzanwendung zusprach. In dem mir vorliegenden Briefwechsel freilich erkennt Kayser an, daß ich den Grundsatz der Anreicherung durch Galle zuerst ausgesprochen und angewendet habe.

Die „Priorität“ des Herrn Stabsarzt Kayser liegt lediglich auf merkantilem Gebiet. Noch ehe meine erste Publikation vorlag, vor Ablauf der Schonzeit also, hatte er bereits die Firma E. Merck beauftragt, mit Galle gefüllte Glasröhrchen herzustellen. Der Artikel erschien auf dem Markt und trug ohne Protest Kayzers die Bezeichnung Typhusgalleröhre Kayser. Erst meine Intervention bewirkte, daß der Versand aufhörte, bis neue Prospekte und Etiketten beschafft waren, die auch meinen Namen trugen und so den Tatsachen Genüge taten. Hingegen verzichtete ich auf eine materielle Beteiligung, die nachträglich Herr Stabsarzt Kayser mir anbot. Hier überließ ich ihm die Verwertung meiner Idee. Da nun die von der Firma E. Merck in den

1) Die veränderten Stellen sind durch Sperrdruck kenntlich gemacht:

Veränderter Text:

„Kayser bestätigte meine Resultate in einer Form, die weder verriet, daß die Verwendung reiner Galle zur Blutkultur eine von ihm mitgeteilte, von mir herrührende Methode darstellt...“

„Conradi hat in seinem Sinne zuerst die reine Galle . . . empfohlen . . .“

Richtiger Text:

„An einem umfangreichen Material bestätigte er (Kayser<sup>1)</sup>) meine Resultate, aber in einer Form, die weder verriet, daß die Verwendung reiner Galle eine ihm mitgeteilte, von mir herrührende Methode darstellte . . .“

„Conradi hat nun in seinem Sinne zunächst die reine Galle . . . empfohlen . . .“

1) Zusatz des Verf.

Handel gebrachten Typhusgalleröhren — allerdings nicht ganz freiwillig — die Namen Kayser und Conradi vereinigen, so wird noch in Fachkreisen fälschlich angenommen, daß auch die wissenschaftliche Ausarbeitung und Anwendung der Anreicherung durch Galle, das heute übliche Verfahren der Blutkultur zur Typhusdiagnose unser Gemeingut seien. Solchen Irrtum endgültig zu beseitigen, ist Zweck dieser Notiz.

*Nachdruck verboten.*

## Zur Technik der Untersuchung der Lumbalflüssigkeit auf Wassermannsche Reaktion.

[Aus der Inneren Abteilung der Krankenanstalt (Magdeburg) Sudenburg (Oberarzt Dr. Ernst Schreiber).]

Von Dr. A. Stühmer, Sekundärarzt der Abteilung.

Die Untersuchung des Liquor cerebrospinalis auf Wassermannsche Reaktion hat in der letzten Zeit, in der die Salvarsantherapie in alle Gebiete der Syphilidologie frisches Leben gebracht hat, ebenfalls an Interesse gewonnen. Beim Studium dieses Gebietes war uns stets der Widerspruch aufgefallen, der zwischen den klinischen Beobachtungen und den Ergebnissen der Laboratoriumsarbeit insofern zu bestehen schien, als gerade bei denluetischen Erkrankungen des Zentralnervensystems der Ausfall der Wassermannschen Reaktion häufig oder nach einigen Autoren sogar meist ein negativer war. Im Gegensatz dazu wurde die Reaktion bei den postsyphilitischen Erkrankungen in der Mehrzahl der Fälle positiv gefunden.

Wir vermuteten daher, daß hier ein Fehler der Methodik falsche Resultate vortäuschen müsse, und suchten diesen Fehler, wie sich dann herausstellte, zutreffenderweise in den Mengenverhältnissen, mit denen allgemein die Wassermannsche Reaktion im Lumbalpunktat vorgenommen wurde.

So betont Plaut in seiner Monographie „Syphilis und Nervensystem“ ausdrücklich, daß er niemals mehr als 0,2 der zu untersuchenden Flüssigkeit verwendet hätte. Und auch sonst fand ich, daß stets analog der Versuchsanordnung bei der Serumuntersuchung 0,2 oder höchstens 0,4 der Lumbalflüssigkeit verwendet wurden. Analog nun den vielfachen Versuchen, den Hemmungstiter eines Blutserums zu bestimmen, um vielleicht dadurch ein klares Bild von der Wirksamkeit einer Therapie zu bekommen, trafen wir die Versuchsanordnung so, daß wir steigende Mengen der zu untersuchenden Lumbalflüssigkeit, nämlich 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 und 1,0 ccm, verwendeten.

Ich fand eine ähnliche Versuchsanordnung nur bei Hauptmann und Hössli (Münch. med. Wochenschr. 1910. No. 30). Diesen Autoren gebührt also das Verdienst, die Unzulänglichkeit des alten Verfahrens zuerst erkannt und eine systematische Titration an seine Stelle gesetzt zu haben.

Entsprechend dem von uns geübten Verfahren bei der Serumuntersuchung prüften wir diese Flüssigkeitsmengen stets gegen zwei Extrakte verschiedener Herkunft. Wir verwenden nämlich einerseits einen der üblichen Extrakte aus kongenitalluetischer Leber, und andererseits einen

Extrakt, welchen wir nach der schon früher von uns beschriebenen Art aus autolytischer Meerschweinchenleber hergestellt hatten (Centralbl. f. inn. Med. 1910. No. 14).

Das hämolytische System, welches wir verwendeten, wurde für jeden Versuch austitriert, das Komplement wie bei unseren regelmäßigen Serumuntersuchungen in der Menge von 0,05 ccm im Röhrchen verwendet. Unter stetiger Kontrolle, also der mit den gleichen Reagentien ausgeführten Blutuntersuchungen, gestaltete sich demnach jede Untersuchung einer Lumbalflüssigkeit, wie es das folgende Schema angibt:

	E. I.	E. II.	NaCl	Erg.
0,2				
0,4				
0,6				
0,8				
1,0				

Jeder Versuch umfaßt also für jedes Lumbalpunktat 15 Röhrchen, abgesehen natürlich von den notwendigen Kontrollen.

Nach dieser Versuchsanordnung haben wir nun in letzter Zeit 105 Lumbalflüssigkeiten untersucht und sind da zu recht interessanten Ergebnissen gekommen. Auf die klinische Seite der Sache näher einzugehen, ist hier nicht der Ort. Es mag daher genügen, daß wir im folgenden in Form einer Tabelle unsere Resultate zusammenstellen:

Wir erzielten insgesamt in 36 von 105 Fällen ein positives Resultat, also in 34,3 Proz. der Fälle.

Von diesen waren positiv in der Konzentration von:

von 0,2 an	15 Fälle,	insgesamt also	14,3 Proz.
" 0,4 "	8 "	" "	21,9 "
" 0,6 "	12 "	" "	33,4 "
" 0,8 "	1 Falle	" "	34,3 "

In allen diesen Fällen lag klinisch Paralyse, Tabes oder Lues cerebrospinalis vor. In keinem klinisch auf Lues unverdächtigen Falle wurde auch in der höchsten Konzentration von 1,0 im Röhrchen eine Hemmung der Hämolyse jemals beobachtet. Die einzige Ausnahme machte ein Fall von Meningitis cerebrospinalis epidemica, welchen ich mehrmals untersuchte und der in den höheren Konzentrationen eine geringe Hemmung zeigte, die allerdings wohl lediglich auf die reichliche Eiterbeimengung zurückgeführt werden muß. Abgesehen von diesem Falle, wurden zu unseren Versuchen ausschließlich absolut blutfreie Lumbalflüssigkeiten verwendet.

Es ergibt sich also aus diesen Zahlen, daß in der Tat durch eine systematische Titration der zu untersuchenden Lumbalflüssigkeit ein erheblich höherer Prozentsatz an positiven Ergebnissen erzielt wird, als mit der gebräuchlichen Methode, ohne daß man Gefahr läuft, unspezifische Hemmungen zu bekommen. Wir fanden vielmehr in allen Fällen das Ergebnis der Laboratoriumsuntersuchung durch den anamnestischen und klinischen Befund bestätigt.

Auf die einzelnen Kategorien der Erkrankungen verteilen sich die positiven Ergebnisse folgendermaßen:

1) Paralyse,

untersucht	12 Fälle,	davon positiv überhaupt	12=100 Proz.
davon von 0,2 an	7 Fälle		58,3 "
" 0,4 "	2 "		75,0 "
" 0,6 "	3 "		100 "



2) <b>Tabes,</b>	
untersucht 23 Fälle, davon positiv überhaupt 9=39,1 Proz.	
davon von 0,2 an 3 Fälle	13,0 "
" 0,4 " 2 "	21,7 "
" 0,6 " 3 "	37,7 "
" 0,8 " 1 Falle	39,1 "
3) <b>Lues cerebrospinalis,</b>	
untersucht 14 Fälle, davon positiv überhaupt 13=92,9 Proz.	
davon von 0,2 an 5 Fälle	35,7 "
" 0,4 " 3 "	57,1 "
" 0,6 " 5 "	92,9 "
" 0,8 " — Fälle	— "

Ein Vergleich dieser Resultate mit denen der früheren Untersuchungen ergibt nun in der Tat sehr wesentliche Unterschiede.

Bei der Paralyse fanden wir, übereinstimmend mit anderen Autoren (Plaut, Pierre-Marie, Levaditi, Morgenroth und Stertz, Marinesco u. a.) regelmäßig positive Reaktion. Die davon etwas abweichenden Ergebnisse verschiedener Untersucher, welche die Reaktion bei der Paralyse nur in etwa 50 Proz. (Neisser, Bruck, Schucht), 70 Proz. (Zaloziecki), oder ähnlich positiv vorfanden, erklären sich, den Ergebnissen in den einzelnen Konzentrationsgraden in unserer Versuchsreihe entsprechend, aus der verschiedenen quantitativen Versuchsanordnung. Und soweit man überhaupt aus einer so kleinen Anzahl von Fällen Schlüsse ziehen darf, scheinen spezifische Hemmungskörper bei der Paralyse mit dieser Titration stets nachweisbar zu sein.

Wesentlich anders dagegen steht es in dieser Hinsicht bei der Tabes. Bei dieser Erkrankung wurden von den verschiedenen Untersuchern positive Reaktionen nur in einem relativ geringeren Prozentsatz der Fälle erzielt. So fand Marinesco in 15 Fällen nur 8 im Liquor positiv, ähnlich wie Benedixsohn, der von 11 Fällen 7 positiv fand. Im Durchschnitt kann man wohl sagen, daß in etwa 50—60 Proz. bei Tabikern im Liquor positive Reaktion gefunden wird. Auch in höheren Konzentrationsgraden wird sich das Bild wohl kaum wesentlich ändern, obgleich unser Material in dieser Hinsicht keine allgemeingültigen Schlüsse zuläßt, weil sich unter unseren Fällen eine sehr große Zahl von alten, stabilen und vielfach spezifisch behandelten Patienten befindet. Auf diese durch Zufälligkeiten äußerer Art bedingte Eigenart unseres Materials führe ich es wohl mit Recht zurück, daß wir nur in 39,1 Proz. bei Tabes positive Resultate erzielten. Ich bin überzeugt, daß sich das Bild erheblich zugunsten der serodiagnostischen Untersuchung verändern würde, wenn zu jenen alten stationären Fällen noch die zahlreichen Patienten mit beginnender, ambulant behandelter Tabes kämen, bei denen sich aus naheliegenden Gründen eine Lumbalpunktion nicht durchführen ließ. Gerade die Fälle mit Tabes incipiens geben ja auch im Blutserum sehr viel mehr positive Ergebnisse als die alten (Reinhart).

Was nun schließlich die Lues cerebrospinalis angeht, so fanden wir unsere Vermutung, daß die von den meisten Autoren beschriebenen häufigen Versager der serodiagnostischen Methode auf einem Fehler der Versuchsanordnung beruhen müßten, durch unsere Ergebnisse vollauf bestätigt.

Zahlreiche Untersucher haben sich mit der serologischen Prüfung des Liquor bei Lues cerebrospinalis befaßt, und sie kamen durchweg zu dem auffälligen Resultat, daß gerade die eigentlichen echt syphilitischen Erkrankungen des Zentralnervensystems in der Mehrzahl der Fälle die Anwesenheit von spezifischen Reaktionskörpern vermissen ließen. So

konnten sie Marie und Levaditi in der Regel nicht nachweisen, Wassermann und Plaut fanden von 8 Fällen alle negativ, ebenso Morgenroth und Stertz, Reinhart kommt zu dem Schluß, daß „die Lues cerebrospinalis im Liquor fast stets negative Resultate gibt“. Es ist dies ein Verhalten, welches schließlich Plaut zu dem Satze führte: „Bei der Lues cerebrospinalis ist die Spinalflüssigkeit in der Regel negativ, das Serum in der Regel positiv. Die Lues cerebrospinalis steht damit im Gegensatz zur Paralyse, da bei dieser sich fast ausnahmslos eine positive Reaktion im Serum und in der Spinalflüssigkeit findet.“ Und es ist denn auch von einigen Autoren dieses eigenartige Verhalten zu differentialdiagnostischen Zwecken empfohlen worden.

Im Gegensatz dazu fand sich unter den von mir untersuchten Patienten nur ein einziger Versager. In den übrigen 13 Fällen wurden die spezifischen Hemmungskörper stets nachgewiesen, und es zeigt die obige Zusammenstellung der Resultate, daß weitaus die Mehrzahl der Fälle erst bei 0,4 oder 0,6 ccm die deutliche Hemmung ergaben. Auf die zum Teil sehr interessanten klinischen Einzelheiten kann hier nicht eingegangen werden, an anderer Stelle werden diese ausführlicher besprochen werden. Es mag hier nur als typisches Beispiel das Versuchsergebnis eines Falles Platz finden, in dem die positive Reaktion allein auf den richtigen Weg zur Diagnose führte.

70. E. G., Lues cerebri?

	E. I.	E. II.	K.	Erg.
0,2	0	0	0	—
0,4	+	+	0	—?
0,6	×	×	0	+
0,8	×	×	0	+
1,0	×	×	0	+

Besonders wichtig an diesem Falle war der gleichzeitige negative Ausfall der Reaktion im Blutserum bei positiver Lumbalflüssigkeit. Ein solches Verhalten, wie es auch schon in seltenen Fällen beschrieben wurde (Jarkowsky und Rajchma, Jakobsthal), konnten wir gerade bei jenen erst in höheren Konzentrationen positiven Patienten mit Lues cerebrospinalis mehrfach beobachten. Auf die Frage des Verhältnisses der Blutreaktion zur Liquorreaktion soll hier ebenfalls nicht näher eingegangen werden. Es mag genügen, darauf hinzuweisen, daß die negative Wassermannsche Reaktion im Blutserum keinesfalls eine positive im Liquor cerebrospinalis ausschließt.

Zusammenfassend muß man also sagen:

1) Die Untersuchung des Liquor cerebrospinalis auf Wassermannsche Reaktion soll stets als Titration mit steigenden Mengen vorgenommen werden.

2) Es findet sich häufig die Reaktion erst bei 0,4, 0,6 ja 0,8 positiv.

3) Es gelingt mit dieser Methode, in fast allen Fällen von Lues cerebrospinalis spezifische Hemmungskörper nachzuweisen.

4) Die negative Reaktion des Blutserums schließt eine positive des Liquor nicht aus.

Nachtrag: Bei weiteren Untersuchungen beobachteten wir einige Male, daß nur das Röhrchen mit 0,4 gehemmt blieb, während in den übrigen, also bei 0,2, 0,6, 0,8 und 1,0, die Lösung prompt eintrat. Es handelte sich bei diesen Fällen um vorgeschrittene Tabeserkrankungen bei sicherer Luesanamnese. Wir registrieren diese Erscheinung hier nur der Vollständigkeit halber, ohne zunächst ihre Bedeutung zu erörtern. Auf eine eigenlösende Wirkung des Liquor in höheren Konzentrationen kann sie nicht zurückgeführt werden, jedenfalls konnten wir eine solche bei zahlreichen Kontrolluntersuchungen nicht feststellen.

*Nachdruck verboten.*

## Beitrag zur Theorie der Desinfektion.

[Aus der chemischen Abteilung des Königl. Instituts für Infektionskrankheiten. (Direktor: Geheimer Obermedizinalrat Prof. Dr. Gaffky. Vorsteher: Prof. Dr. Lockemann).]

Von Dr. Fr. Croner.

Mit 2 Kurven im Text.

Seit einigen Jahren hat man verschiedentlich versucht, den Verlauf des Absterbens großer Bakterienmengen unter dem Einfluß eines schädigenden Agens mit physikalisch-chemischen Gesetzen in Einklang zu bringen.

In der Art, wie die Keimverminderung von Milzbrandsporen unter dem Einfluß von Sublimat nach den Untersuchungen von Krönig und Paul<sup>1)</sup> vor sich geht, fanden Madsen und Nyman<sup>2)</sup> eine gute Uebereinstimmung mit den Vorgängen, die man bei chemischen Reaktionen mit dem Namen „monomolekulare Reaktionen“ bezeichnet. Bei diesen Reaktionen ist der eine reagierende Bestandteil dem anderen gegenüber in großem Ueberschuß vorhanden, so daß während der ganzen Reaktion praktisch eine Abnahme seiner Konzentration nicht stattfindet. Die Umsetzung verläuft alsdann in dem Sinne, daß in jedem Zeitpunkt die Abnahme der in geringerer Menge von Molekülen vorhandenen Substanz der jeweilig vorhandenen Menge proportional ist. Das Maß der Umsetzung ist bei verschiedenen Substanzen eine verschiedene, für jede einzelne eine bestimmbare und konstante Größe, die man als Reaktionsgeschwindigkeitskonstante bezeichnet, die jedoch von der Temperatur abhängig ist.

Auf das Desinfektionsgebiet angewendet, stellt die Desinfektionsflüssigkeit oder ein beliebig anderes schädigendes Agens den überschüssigen Reaktionskörper dar, während die Bakterien dem in geringen Mengen vorhandenen Körper entsprechen. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante wird hier als Desinfektionsgeschwindigkeitskonstante bezeichnet.

Diese Theorie ist dann später von Chick<sup>3)</sup>, Paul<sup>5)</sup> und seinen Mitarbeitern Birstein<sup>6)</sup>, Reuss<sup>6)</sup> u. a. weiter ausgebaut worden. Je-

1) Krönig u. Paul, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 25. 1897. p. 1.

2) Madsen u. Nyman, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 57. 1907. p. 388.

3) Chick, The Journ. of Hyg. Vol. 8. 1908. p. 92.

4) Paul, Biochem. Zeitschr. Bd. 18. 1909. p. 1.

5) u. 6) Paul, Birstein u. Reuss, Biochem. Zeitschr. Bd. 25. 1910. p. 367 u. Bd. 29. 1910. p. 202 u. 249.

doch bereits bei den Untersuchungen Chicks waren Abweichungen von dieser Regel bei Verwendung von Typhusaufschwemmungen als Testmaterial festgestellt worden, und Reichenbach<sup>1)</sup> konnte gleichfalls Ausnahmen bei sporenhaltigem Material mitteilen. Nach seiner Ansicht ist die Uebereinstimmung der monomolekularen Reaktionen mit der Abtötung der Milzbrandsporen eine rein zufällige und beruht auf der Resistenz der Sporen; diese ist bei einer großen Menge von Milzbrandsporen sehr verschieden, neben vielen wenig resistenten finden sich wenige sehr resistente, was mit dem Alter und den Sporulationsvorgängen im Zusammenhang stehen soll. Bei anderen sporenbildenden Bakterien hat Reichenbach eine derartig gesetzmäßige Resistenz nicht beobachten können.

Madsen und Nyman haben nun weiter gefunden, daß, wenn man Desinfektionsmittel bei verschiedener Temperatur auf Milzbrandsporen einwirken läßt, die Geschwindigkeit des Absterbens demselben Gesetze folgt, das von Arrhenius für die Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen Temperaturen gefunden wurde. Dies Gesetz besagt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit, also hier die Desinfektionsgeschwindigkeit, für jede Steigerung von  $10^{\circ}$  sich etwa verdoppelt. Auch dieses Gesetz ist für die Einwirkung der Desinfizienzien auf Bakterien etwa für Temperaturen von  $10-37^{\circ}$  als allgemeingültig angenommen worden.

Die nachstehenden Versuche sollen zeigen, daß auch hier mit gewissen Beschränkungen zu rechnen ist, und daß es nicht angeht, die Bakterien unter allen Umständen einfach als Moleküle zu betrachten, ohne Berücksichtigung ihrer physiologischen Lebenserscheinungen, unter denen die Vermehrungsfähigkeit die erste Rolle spielt. Es ist richtig, daß man Bakterien unter Bedingungen bringen kann, die ihnen jede Wachstumsmöglichkeit nehmen, wenn man sie z. B. an Granate antrocknet; dann werden sie mehr oder weniger Molekülen ähnlich. Diese Versuchsanordnung ist von den meisten früheren Autoren bei ihren Versuchen gewählt worden; sie entspricht aber, wie erwähnt, nicht den normalen Bedingungen.

Es ist nun schon lange vor Madsen's und Nyman's Untersuchungen bekannt gewesen, daß Desinfektionsmittel bei höherer Temperatur, z. B.  $37^{\circ}$ , stärker wirken als bei Zimmertemperatur. Heider<sup>2)</sup> und Henle<sup>3)</sup> haben bereits Ende der 80er Jahre des vorigen Jahrhunderts darauf aufmerksam gemacht, und diese Erfahrungen sind seitdem allgemein bestätigt worden.

Andererseits ist es eine ebenso bekannte Tatsache, daß Bakterien bei höheren Temperaturen eine größere Lebensenergie zeigen als bei tiefen. So liegt das Wachstumsoptimum der pathogenen Bakterien bei  $37^{\circ}$ .

Die Frage, die ich mir stellte, war die: Ist die Verstärkung der Wirkung eines Desinfektionsmittels bei  $37^{\circ}$  gegenüber einer solchen von Zimmertemperatur eine größere als die Vermehrung der Lebensenergie der Bakterien, vorausgesetzt, daß diese sich in einem günstigen Nährmedium befinden?

1) Reichenbach, diese Zeitschr. Abt. I. Ref. Bd. 47. Anhang. 1910. p. 75. [Die ausführliche Publikation Reichenbachs (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 69. 1911. Heft 1) lag mir erst während der Drucklegung vor.]

2) Heider, Diese Zeitschr. Bd. 9. 1890.

3) Henle, Arch. f. Hyg. Bd. 9. 1889.

### Versuchs-anordnung.

24-stündige Bouillonkulturen von Bakterien wurden filtriert. Zu je 3 ccm dieser Aufschwemmung, die sich in sterilen Röhrchen befand, wurden 3 ccm Desinfektionsmittel in verschiedenen Konzentrationen gegeben. Jedes dieser Gemische stellte alsdann eine Desinfektionsflüssigkeit dar von halber Konzentration wie die der ursprünglichen Desinfektionsflüssigkeit. Diese erste Serie von Bakterien in Bouillon + Desinfektionsmittel wurde bei Zimmertemperatur (16—18°) gehalten. Eine zweite Serie, genau in derselben Weise hergestellt, also mit derselben filtrierten Bouillonkultur und denselben Konzentrationen des Desinfizienz, wurde im Thermostaten bei 37° gehalten. Um zu verhindern, daß bei dieser höheren Temperatur durch Verdunstung von Wasser eine Verstärkung der Konzentration des Desinfektionsmittels eintrat, oder daß das verdampfende Wasser unkontrollierbare Mengen des Desinfektionsmittels mit forttrieb (Phenol z. B. ist mit Wasserdämpfen flüchtig), wurden die Röhrchen dieser zweiten Serie mit Gummikappen versehen.

Um den ursprünglichen Keimgehalt der Bouillonkulturen zu bestimmen, wurden mit der Pipette gemessene Mengen entnommen und in Petri-Schalen mit verflüssigtem Agar von 42° übergossen. Zur Erleichterung der Keimzählung wurde gewöhnlich die Stammbouillonkultur vorher mit gemessenen sterilen Bouillonmengen verdünnt.

Die Wirkung der Desinfektionsmittel wurde alsdann nach ein oder mehreren Tagen, eventuell auch mehrmals bestimmt.

Die Schwierigkeit, mit der hierbei zu kämpfen war, bestand darin, gerade soviel Bakterien-Desinfektionsmittelgemisch zu entnehmen, daß nach seiner Verarbeitung zu Agarplatten nicht zu wenig und nicht zu viel Keime auf den Platten vorhanden waren. Es war deshalb fast für jeden einzelnen Versuch notwendig, Vorproben anzustellen, aus denen ein Bild gewonnen werden konnte, ob eine Keimvermehrung oder -verminderung zu erwarten war. Nach diesen orientierenden Versuchen wurde dann bei den eigentlichen Versuchen die Menge des zu verarbeitenden Materials ausgewählt. War z. B. in einem Röhrchen durch Trübung bereits zu erkennen, daß eine große Keimvermehrung stattgefunden hatte, so wurde das Material unter Umständen auf das Millionenfache verdünnt. Ich bin mir vollständig bewußt, daß hierdurch große Fehlerquellen entstanden sind; da aber bei den Versuchen die Zahl der Keime zwischen Sterilität und ganz vereinzelter Bakterien auf der einen Seite und Tausenden von Millionen auf der anderen Seite schwankte, so spielte bei den höchsten Zahlen ein Fehler von einigen Millionen Keimen keine wesentliche Rolle.

Als Desinfizienzien bei diesen Versuchen habe ich mit Absicht nur Phenol und Lysol benutzt, weil diese beiden Substanzen eine geringe Entwicklungshemmung besitzen. Gerade darauf mußte Rücksicht genommen werden, da nicht wie bei qualitativen Desinfektionsversuchen eine gleichmäßige Verdünnung des mitübertragenen Desinfektionsmittels in flüssigen Nährböden stattfand, sondern das Bakterien-Desinfektionsmittelgemisch direkt zu Agarplatten verarbeitet wurde. Fehlerquellen durch Entwicklungshemmung sind meines Erachtens nicht entstanden, wenn man folgendes berücksichtigt: Die stärksten Konzentrationen des Desinfektionsmittels, die überhaupt angewendet wurden, betrugen 0,5 Proz. Nur in ganz vereinzelter Fällen, wo völlige Sterilität von vornherein

anzunehmen war, wurde ein ganzer Kubikzentimeter direkt zu Agarplatten verarbeitet, für die 10—15 ccm Agar benutzt wurden. In diesem Falle würden in 10 ccm Agar 5 mg Desinfektionsmittel enthalten sein, was einer Verdünnung 1:2000 entspräche. Nun geht aber gerade aus meinen später mitzuteilenden Versuchen hervor, daß eine derartige Verdünnung bei den angewendeten Desinfektionsmitteln keine entwicklungshemmenden Eigenschaften mehr besitzt. Wie gesagt, hat eine direkte Uebertragung von 1 ccm nur ganz wenige Male stattgefunden und dann nur bei den korrespondierenden Proben der beiden Serien gleichzeitig. Eine Verschiebung der Resultate zugunsten der einen oder anderen Seite kann also nicht stattgefunden haben.

### Vorversuch

(ohne vorherige Zählung der ursprünglichen Keime).

Filtrierte Staphylokokkenbouillon (3 ccm) wird mit gleichen Mengen Phenol (0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 und 0,05 Proz.) versetzt. Die entstehenden Lösungen enthalten also 0,25, 0,20, 0,15, 0,10, 0,05, 0,025 Proz. Phenol.

Je zwei gleiche Proben werden bei Zimmertemperatur (No. 1, 2, 3, 4, 5, 6) und bei Bruttemperatur (No. 7, 8, 9, 10, 11, 12) gehalten.

#### Ergebnis nach 6 Tagen.

No. 1	29 100 000 Keime	No. 7	77 400 000 Keime
„ 2	85 200 000 „	„ 8	210 000 000 „
„ 3	43 801 000 „	„ 9	75 000 000 „
„ 4	71 100 000 „	„ 10	94 000 000 „
„ 5	70 200 000 „	„ 11	82 000 000 „
„ 6	unzählige „	„ 12	unzählige „

#### Nach 12 Tagen.

No. 1	75 300 000 Keime	No. 7	unzählige Keime
„ 2	43 200 000 „	„ 8	504 000 000 „
„ 3	293 000 000 „	„ 9—12	unzählige „
„ 4—6	unzählige „		

#### Nach 15 Tagen.

No. 1	14 000 000 Keime
„ 2	31 000 000 „
„ 3	328 000 000 „
„ 4	1 020 000 000 „
„ 5—12	unzählige „

Bei diesem Versuch war die ursprüngliche Anzahl Keime, wie bereits bemerkt, nicht bestimmt worden. Die erste Probeentnahme fand erst nach 6 Tagen statt. Das Ergebnis ist noch nicht übersichtlich, bemerkbar macht sich nur in beiden Reihen eine zunehmende Vermehrung der Keime mit abnehmender Konzentration des Desinfektionsmittels, die bei der schwächsten Konzentration zu nicht mehr numerisch festzustellenden Mengen führt. Bei den in Thermostaten aufbewahrten Proben sind die gefundenen Keimzahlen im Durchschnitt beträchtlich höher als bei den bei Zimmertemperatur aufbewahrten. Nach 10 und 15 Tagen ist bei den im Thermostaten aufbewahrten Proben die Zahl fast allgemein unendlich groß, während bei Zimmertemperatur noch bestimmbare Zahlenwerte gefunden wurden. Bemerkenswert ist vielleicht noch, daß bei No. 1, 2 und 3 die Keimzahlen nach 15 Tagen wieder im Rückgang begriffen sind.



## Versuch 1.

Von einer filtrierten Staphylokokkenkultur werden 0,1 ccm in 80 ccm Bouillon übertragen. 1 ccm dieser Verdünnung enthält 326 700 Keime pro Kubikzentimeter.

Zu je 3 ccm dieser Bouillonverdünnung werden 3 ccm Phenollösung gegeben, und zwar von 1,0, 0,5, 0,1 Proz. Das Gemisch enthielt also 0,5 bzw. 0,25 bzw. 0,05 Proz. Lysol. Es wurden von diesen Verdünnungen 2 Serien hergestellt, von denen die eine bei 16–18°, die andere bei 37° gehalten wurde (No. 1–3, 4–6).

Nach 24 Stunden waren No. 1–5 klar, No. 6 getrübt.

## Wachstumsergebnis.

No. 1	steril	No. 4	steril
„ 2	2 930 000 Keime	„ 5	120 000 Keime
„ 3	52 200 000	„ 6	unzählige „
Nach 48 Stunden.		No. 3	getrübt.
No. 1	steril		
„ 2	130 000 Keime		
„ 3	unzählige Keime		
„ 4	steril		
„ 5	20 000 Keime		
„ 6	unzählige Keime		

Aus diesen Versuchen geht hervor:

0,5 Proz. Phenol vernichtet in 24 Stunden bei Zimmertemperatur und bei 37° alle Staphylokokken unter den gegebenen Bedingungen. 0,25 Proz. Phenol läßt zunächst bei Zimmertemperatur die Keime auf das Dreifache ansteigen, nach 48 Stunden findet jedoch bereits eine Abnahme der Keime unter die ursprüngliche Keimzahl statt. Bei 37° sinkt die Keimzahl schon nach 24 Stunden auf den dritten Teil der ursprünglichen Keime, nach weiteren 24 Stunden schreitet die Verminderung fort. 0,05 Proz. Phenol läßt bei Zimmertemperatur nach 24 Stunden bereits ein beträchtliches Ansteigen der Keimzahlen zu, bei 37° ist die Keimmenge nicht mehr zählbar, was bei Zimmertemperatur erst nach 48 Stunden erreicht wird.

Wir beobachten hier also bei höheren Phenolkonzentrationen eine Keimverminderung, die bei Brutwärme schneller verläuft als bei Zimmertemperatur, bei niedrigen Konzentrationen eine Keimvermehrung, die im Gegenteil bei 37° schneller vor sich geht als bei 16–18°. Diese Erscheinung tritt in den folgenden Versuchen mit engeren Abstufungen des Desinfektionsmittels noch deutlicher zutage.

## Versuch 2.

Staphylokokkenbouillonkultur. Ursprüngliche Keimzahl 73 000 Keime pro Kubikzentimeter. Phenollösungen 1,0, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2, 0,1 Proz. Phenolgehalt des Phenolbakteriengemisches 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05 Proz. Zwei Serien: 16–18° (No. 1–6), 37° (No. 7–12). Nach 24 Stunden sind No. 11 und 12 stark getrübt.

## Keimzählung:

No. 1	steril	No. 7	steril
„ 2	steril	„ 8	steril
„ 3	steril	„ 9	steril
„ 4	50 000 Keime	„ 10	steril
„ 5	3 630 000 „	„ 11	2 460 000 000 Keime
„ 6	12 900 000 „	„ 12	3 460 000 000 „

12\*

## Nach 48 Stunden:

(No. 1, 2, 3, 7, 8, 9, 11, 12  
wurden nicht mehr verarbeitet,  
da die Resultate bereits fest-  
standen)

No. 4 400 Keime  
" 5 5 100 000 "  
" 6 ca. 960 000 000 "

No. 10. 1 ccm direkt ver-  
arbeitet, während nach 24 Std.  
nur  $\frac{1}{10000}$  ccm der Original-  
lösung verarbeitet worden war:  
182 Keime

Auch bei diesem Versuch zeigt sich, daß bei höheren Konzentrationen die Desinfektionswirkung bei 37° eine stärkere ist als bei Zimmertemperatur. Bei 0,2 Proz. Phenol und Zimmertemperatur findet nach 24 Stunden eine Verminderung der Keime kaum statt, doch ist nach 48 Stunden eine deutliche Beeinflussung durch das Desinficiens zu beobachten; mit weiterem Sinken der Konzentration ist eine Vermehrung zu beobachten. Charakteristisch ist, daß bei höherer Temperatur die Unterschiede ungleich schroffer sind. No. 10 ist nach 48 Stunden fast steril, die Zahl der Keime in No. 11 ist in derselben Zeit kaum noch bestimmbar, trotz eines Konzentrationsunterschiedes von nur 0,1 Proz. Phenol.

## Versuch 3.

Colibacillen in Bouillon. Keimzahl beim Beginn des Versuches 10440 pro Kubikzentimeter.

Zur Orientierung wurden nur 3 Konzentrationen verwendet. Je 3 ccm Coli-Bouillon werden mit 3 ccm Phenol (1,0, 0,5, 0,1 Proz.) versetzt. Die Gemische enthalten folglich 0,5, 0,25 und 0,05 Phenol. Zwei Serien: 18° und 37° (No. 1—3; 4—6). Nach 24 Stunden sind die Röhrchen 3 und 6 getrübt.

## Keimzählung:

No. 1 steril  
" 2 20 000 Keime  
" 3 420 000 000 "  
" 4 steril  
" 5 30 000 Keime  
" 6 5 160 000 000 "

## Nach 48 Stunden:

No. 1 steril  
" 2 steril  
" 3 unzählig  
" 4 steril  
" 5 84 Keime  
" 6 unzählig

Der orientierende Versuch entsprach im allgemeinen den vorhergehenden Staphylokokkenversuchen.

## Versuch 4.

Coli-Bouillon. Ursprüngliche Keimzahl 120 000 pro Kubikzentimeter. 3 ccm Coli-Bouillon wurden mit gleichen Mengen Phenollösungen versetzt: 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 Proz. Die entstehenden Konzentrationen betrugen folglich: 0,40, 0,35, 0,30, 0,25, 0,20, 0,15 und 0,10 Proz. Phenol. Zwei Serien, No. 1—8 bei 18°, No. 9—16 bei 37°. Nach 24 Stunden waren getrübt die No. 7, 8, 13, 14, 15, 16.

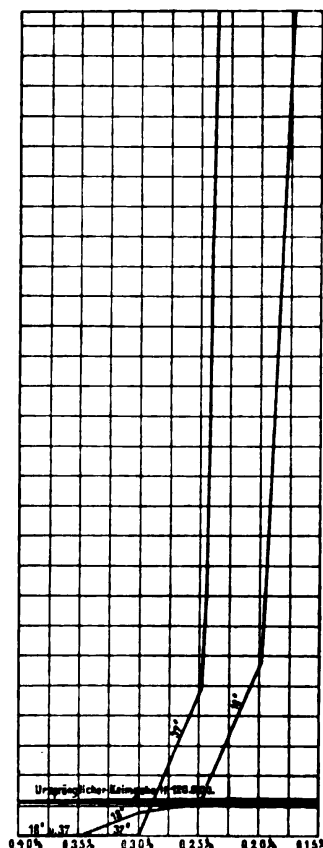
## Ergebnis der Keimzählung:

No. 1 steril  
" 2 392 Keime  
" 3 80 000 "  
" 4 107 000 "  
" 5 570 000 "  
" 6 2 220 000 "  
" 7 48 000 000 "  
" 8 153 000 000 "

No. 9 steril  
" 10 steril  
" 11 4000 Keime  
" 12 480 000 "  
" 13 9 600 000 "  
" 14 51 000 000 "  
" 15 150 000 000 "  
" 16 168 000 000 "

Es zeigt sich hier, daß in den höchsten Konzentrationen (0,40 Proz.) sowohl bei 18° als auch bei 37° innerhalb 24 Stunden Abtötung erfolgt ist. Bei den nächstfolgenden Konzentrationen (0,35, 0,30 Proz.) erfolgt bei den beiden angewendeten Temperaturen eine Verminderung der Keimzahl, die bei 0,35 und 37° noch zur Sterilität führt. Bei der nächstfolgenden Konzentration (0,25) tritt ein erheblicher Umschlag ein: bei 18° noch eine Keimverminderung, bei 37° schon eine gewaltige Keimvermehrung gegenüber der ursprünglichen Keimzahl. Bei den nächst schwächeren Konzentrationen ist auch bei Zimmertemperatur das Desinficiens nicht mehr imstande, die Keimzahl zu vermindern, jedoch macht sich bei der höheren Temperatur das Fortpflanzungsvermögen der Bakterien in beträchtlich stärkerem Maße geltend. Bei der höchsten Verdünnung ist der Unterschied der Keimzahl nicht besonders groß (153 000 000 gegen 168 000 000).

Stellt man sich dieses Ergebnis in Form einer Kurve (Kurve 1) dar, so kann man sehen, wann bei den angewandten Temperaturen die Wirkung des Desinficiens und die der Fortpflanzungsgeschwindigkeit der Bakterien sich gegenseitig die Wage halten. Bei 18° ist bei einer Konzentration des Phenols von etwa 0,247 Proz. eine Stabilität der Bakterien vorhanden, bei 37° bei 0,290 Proz. Bei 0,291 Proz. ist die Wirkung der kalten Desinfektionslösung dieselbe wie die der erwärmten. Ein Zustand der Entwicklungshemmung ist bei 18° etwa zwischen 0,35 und 0,175 Proz. zu erkennen, während er bei 37° bereits mit 0,20 Proz. überwunden ist. Es zeigt sich also, daß man bei niedrigeren Temperaturen mit geringeren Mengen Desinfektionsmittel eine ebenso starke Entwicklungshemmung hervorrufen kann wie bei höherer Temperatur mit größeren Mengen; oder anders ausgedrückt: bei Verwendung gleicher Mengen Desinfektionsmittel ist die Entwicklungshemmung bei niedriger Temperatur größer als bei höherer.



Kurve 1.

Die Höhe jedes Quadrats entspricht 100 000 Keimen.

Keimzählung nach 48 Stunden. (No. 1, 9 und 10 wurden nicht mehr geprüft.)

No. 2	930 Keime	No. 11	28 Keime
„ 3	25 680 „	„ 12	72 000 „
„ 4	39 540 „	„ 13	*800 000 „
„ 5	*480 000 „	„ 14	66 000 000 „
„ 6 und 7 waren wegen ungünstig. Verdünnung nicht zählbar		„ 15	75 000 000 „
„ 8	260 000 000 Keime	„ 16	330 000 000 „

Das Ergebnis nach 48 Stunden zeigt im allgemeinen Resultate, wie sie nach dem 24-stündigen Ergebnis zu erwarten waren: eine weitere Keimverminderung dort, wo sie schon nach 24 Stunden eingesetzt hatte, und ein weiteres Anwachsen der Keime da, wo es schon in Gang ge-

kommen war. Einige aus diesem Ergebnis herausfallende Zahlen sind wahrscheinlich auf die der Technik anhaftenden Ungenauigkeiten zurückzuführen. Sie sind in der Tabelle mit \* bezeichnet.

Der folgende Versuch,

#### Versuch 5,

wurde mit Lysol als Desinfektionsmittel angestellt. Testmaterial *Bact. coli*, ursprüngliche Keimzahl 27 000 000 pro Kubikzentimeter.

Je 3 ccm Coli-Bouillon wurden mit absteigenden Mengen Lysol versetzt. Verwendet wurden folgende Konzentrationen: 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 Proz. Die entstehenden Gemische stellten also Lysolkonzentrationen von 0,40, 0,35, 0,30, 0,25, 0,20, 0,15, 0,10, 0,05 Proz. dar. Serie 1 bei 18° (No. 1–8), Serie 2 bei 37° (No. 9–16).

#### Resultat nach 24 Stunden:

No. 1	steril	No. 9	steril
„ 2	steril	„ 10	steril
„ 3	600 Keime	„ 11	steril
„ 4	405 000 „	„ 12	1600 Keime
„ 5–8	unzählbar	„ 13	21 600 „
(No. 5–7 infolge unzweckmäßiger Anlage der Platten)		„ 14–16	unzählbar

Zwar ließen sich bei den schwächsten Konzentrationen die Bakterienmengen nicht mehr numerisch feststellen, doch war makroskopisch zu beobachten, daß Platte 16, die unter denselben Bedingungen hergestellt war wie Platte 8, wesentlich mehr Keime aufwies als letztere.

Es zeigte sich bei diesem orientierenden Versuch bereits wieder, daß bei höheren Konzentrationen die Wirkung des erwärmten Desinficiens eine stärkere ist als des nicht erwärmten, daß jedoch auch hier in starken Verdünnungen die Keimzahl der kalten Lösung eine geringere ist als in der erwärmten. Entsprechend der stärkeren Wirkung des Lysols liegt aber der Schnittpunkt der beiden Kurven bei niedrigeren Konzentrationen als beim Phenol.

Bei dem nächsten Versuch,

#### Versuch 6,

wurde mit denselben Konzentrationen wie im vorhergehenden gearbeitet, die ursprüngliche Zahl der Bakterien aber wesentlich verringert. Testmaterial *Bact. coli*, ursprüngliche Keimzahl 147 000 pro Kubikzentimeter.

Je 3 ccm Coli-Bouillon werden mit 3 ccm Lysollösung in absteigenden Mengen versetzt; die Gemische stellen, wie in dem vorhergehenden Versuch, Lysollösungen folgender Konzentrationen dar: 0,40, 0,35, 0,30, 0,25, 0,20, 0,15, 0,10, 0,05 Proz.

#### Ergebnis nach 24 Stunden:

No. 1	steril	No. 9	steril
„ 2	steril	„ 10	steril
„ 3	steril	„ 11	steril
„ 4	3500 Keime	„ 12	steril
„ 5	20 000 „	„ 13	2700 Keime
„ 6	92 000 „	„ 14	117 000 „
„ 7	1 780 000 „	„ 15	21 300 000 „
„ 8	47 300 000 „	„ 16	69 000 000 „

Das Ergebnis dieses Versuches wurde gleichfalls in Form einer Kurve (Kurve 2) dargestellt.

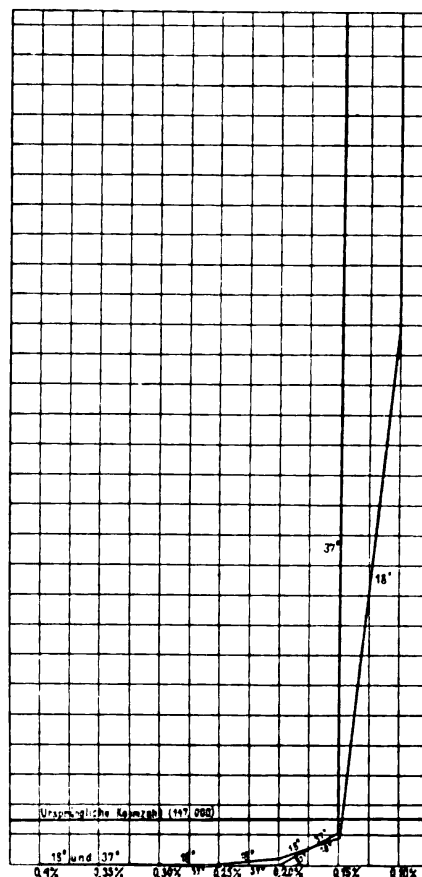
Bei 0,175 Proz. Lysol ist die desinfizierende Wirkung der verschiedenen temperierten Lösungen die gleiche. Etwa bei 0,15 Proz. findet für beide Temperaturen ein Ausgleich zwischen der desinfizierenden Wirkung und der Wachstumsenergie der Bakterien statt. Das Gebiet der Entwicklungshemmung ist bei 37° klein: es liegt zwischen 0,25 und 0,15 Proz., während es bei 18° zwischen 0,30 und 0,10 Proz. liegt. Es zeigt sich also auch hier wieder, daß man bei niedrigeren Temperaturen mit geringeren Konzentrationen eher eine Entwicklungshemmung hervorrufen kann als mit höheren bei erhöhter Temperatur.

Nach 48 Stunden war das Ergebnis des Versuches 6 folgendes:

No. 1—3	steril	
4		15 Keime
5		2100 "
6		*201 000 "
7		84 000 000 "
8		unzählig
9—12	steril	
13		35 Keime
14		3 600 000 "
15		*45 000 000 "
16		unzählig

Das Resultat dieses Versuches nach 2 Tagen entspricht den Erwartungen. Dort, wo schon nach 24 Stunden Keimverminderung zu beobachten war, hat dieser Prozeß weitere Fortschritte gemacht, umgekehrt bei den Konzentrationen, wo schon eine Keimvermehrung stattgefunden hatte, hat sich diese noch vergrößert. Aus dem Rahmen herausfallend die Zahlen von No. 6 und 15, für letztere war eine etwas höhere Keimzahl anzunehmen gewesen.

Die vorliegenden Mitteilungen behandeln nur ein ganz kleines Gebiet und ließen sich noch nach verschiedenen Seiten vervollständigen. Man könnte die Versuche mit verschiedenen Bakterien, anderen Desinfektionsmitteln, bei den verschiedensten Temperaturen ausführen. Ich glaube jedoch, daß damit nicht allzuviel gewonnen sein wird. Es kam hier darauf an, die Frage zu prüfen, ob man bei Desinfektionsversuchen die Bakterien einfach als Moleküle ansehen kann, und diese Frage ist meiner Ansicht nach zu verneinen. Ich bezweifle nicht, daß innerhalb gewisser Grenzen, die durch die Bakterienart und das Desinfektionsmittel gegeben sind, die Bakterien wie Moleküle durch Desinfektionsmittel beeinflusst werden, aber man darf nicht verallgemeinern, und ich glaube nicht, daß es angängig ist, für die Wertbestimmung von chemischen Desinfektionsmitteln die Gesetze der physikalischen Chemie, die für Moleküle Gültigkeit haben, ohne Einschränkung auf Bakterien anzuwenden.



Kurve 2.

Die Höhe jedes Quadrats entspricht 100 000 Keimen.

*Nachdruck verboten.*

## Ueber die Bedeutung der Thermopräzipitinreaktion nach Ascoli für die Diagnose des Milzbrandes.

### Experimentelle Untersuchungen.

[Institut für Seuchenlehre der K. Tierärztlichen Hochschule in Turin.]

Von Dr. Federico De Gasperi.

Die Arbeiten über die im weiteren Sinne spezifischen Präzipitine einiger antibakterieller Immunsera sind allgemein bekannt; ebenso wohl bekannt und richtig eingeschätzt ist auch die Nützlichkeit ihrer Anwendung bei der Diagnose mancher Infektionen und bei der Lösung vieler Probleme der allgemeinen Biologie, so daß ich hier weder die Methode im einzelnen zu schildern, noch ihre volle Bedeutung darzulegen brauche.

Es ist jedoch unbedingt nötig, daß ich auf die Arbeiten von Ascoli über die Präzipitinreaktion beim Milzbrand hinweise, ebenso wie auf die der anderen Forscher, die sich nach ihm mit demselben Problem beschäftigt und dabei den von ihm so richtig vorgezeichneten Weg eingeschlagen haben, und zwar darum, weil gerade das Studium dieser Arbeiten, insbesondere der von Ascoli mir die Idee eingab, auch meinerseits die in der Folge geschilderten Versuche anzustellen, die in innigem Zusammenhang mit den seinen stehen.

Es ist bekannt, daß Ascoli vor mehr als einem Jahr die ersten Ergebnisse seiner zusammen mit Valenti angestellten Versuche über die biologische Diagnose des Milzbrandes veröffentlicht hat; schon damals berichteten diese Autoren, daß das Serum gegen Milzbrand ihnen manches Mal auch mit der Eigenschaft begabt erschien, in Flüssigkeiten, die Produkte aus Milzbrandbacillen enthalten, eine Niederschlagsbildung hervorzurufen. Sie fügten hinzu, daß die Erscheinung so klar und deutlich auftritt, daß es geradezu verwunderlich sei, wenn sie nicht schon früher die Aufmerksamkeit der Untersucher auf sich gelenkt hatte. Man findet jedoch diese präzipitierende Fähigkeit des spezifischen Serums relativ selten — die besagten Autoren fanden sie nur bei 3 Seris unter mehr als 30 untersuchten — wie schon Bail<sup>1)</sup> als erster angab, der sie jedoch mit dem Koagulationsvermögen des normalen Serums aus der Flüssigkeit des Milzbrandödems verwechselt hatte; Carini hingegen hielt sie für ein Agglutinationsphänomen, Gruber<sup>2)</sup> schließlich erkannte sie wohl richtig und kündigte weitere Untersuchungen über eine derartige Eigenschaft an, unterließ sie aber dann, vielleicht weil er meinte, sich getäuscht zu haben, da er sie bei anderen Seris gegen Milzbrand nicht wieder fand; damit ist auch erklärt, warum sie den früheren Untersuchern immer entgehen konnte.

Nach und nach veröffentlichte Ascoli in einer Reihe von Arbeiten, deren letzte vor wenigen Monaten erschien, die vielfachen Untersuchungen, die er ausgeführt hat und wobei es ihm gelang, die Präzipitinreaktion für die Praxis absolut brauchbar zu machen.

Er ist nämlich allmählich dazu gelangt, die Annahme der Spezifität der Präzipitinreaktion durch einen beträchtlichen Beitrag an neu gesammelten Daten festzustellen; er konnte die grundlegende Einheit bestimmen, um die Aktivität des Präzipitins zu kontrollieren und jeden Anlaß zu Fehlern in der Technik zu eliminieren; er gab auch die Herstellungsweise eines sicher präzipitierenden Serums und der Extrakte an. Schließlich erklärt er die Präzipitindiagnose für der bakteriologischen und biologischen Kontrolle überlegen und gibt uns Aufschluß über seine Thermopräzipitinmethode,

1) Bail, Oskar, Untersuchungen über natürliche und künstliche Milzbrandimmunität. X. Die künstliche Immunität des Kaninchens. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 36. p. 271.) Vgl. auch Bail, Versuche über die Wirkungsweise des Milzbrandserums. (Fol. serol. Bd. 4. p. 134.)

2) Gruber u. Futaki, Weitere Mitteilungen über die Resistenz gegen Milzbrand. (Deutsche med. Wochenschr. 1907. No. 39.)



bei der Diagnose des Milzbrandes, die auf seiner jüngsten Entdeckung von der Thermostabilität der präzipitierbaren Substanz beruht; diese wissenschaftlich und praktisch hochbedeutsame Entdeckung macht die Präzipitinreaktion zu einer so einfachen und rasch arbeitenden diagnostischen Methode, daß sie auch von solchen Leuten ausgeführt werden kann, die, wie der praktische Arzt und Tierarzt, nicht die Möglichkeit haben, sich selbst nur mit den einfachsten, zum Studium der elementarsten Probleme der Bakteriologie und Biologie notwendigen Verfahren vertraut zu machen.

Die Thermopräzipitinreaktion von Ascoli ist, wie bekannt, aus den Versuchen dieses Autors über die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Milzbrandpräzipitogens hervorgegangen. Diese Substanz steht wegen ihres Verhaltens gegenüber verschiedenen Katalysatoren den Präzipitinogenen der Cholera und des Typhus nahe; die von Pick<sup>1)</sup> untersucht wurden; sie weist nämlich eine bemerkenswerte Resistenz gegen proteolytische und amylolytische Fermente und gegen Hitze auf, so daß sie durch Erwärmung nur wenig angegriffen wird. Ich habe schon von der großen praktischen Bedeutung dieser physikalischen Eigenschaft der Substanz gesprochen, welche mit dem Präzipitin des Milzbrandserums spezifisch reagiert; ich will jetzt nur noch hinzufügen, daß die Reaktion in wenigen Minuten ausgeführt werden kann, weil man nur ein wenig von dem Untersuchungsmaterial, das man in einer Eprouvete mit dem 3- bis 5-fachen seines Volumens an physiologischer Kochsalzlösung versetzt hat, 3 Minuten lang in ein kochendes Wasserbad einzutauchen braucht; dann kühlt man es in fließendem Wasser ab, filtriert es durch ein Leinwandfilter und führt schließlich die ringförmige Reaktion aus, indem man den Extrakt mit einer gleichen Menge des präzipitierenden Serums unterschichtet.

Die ersten Untersuchungen zur Kontrolle der Arbeiten von Ascoli wurden in Deutschland ausgeführt und die Schlüsse, zu denen die deutschen Autoren gelangten, sind für unseren italienischen Forscher überaus schmeichelhaft.

So sagt Bierbaum, daß man „mit dem präzipitierenden Serum von Ascoli die Milzbrandinfektion mit Bestimmtheit auch dann nachweisen kann, wenn die gewöhnlichen bakteriologischen Methoden wegen vorgeschrittener Fäulnis des Ausgangsmaterials teilweise oder gänzlich negative Resultate ergeben“.

Pfeiler, der bei seinen Versuchen ebenfalls das präzipitierende Serum von Ascoli angewendet hat, schreibt: „Die Versuche haben also zu denselben Ergebnissen geführt, die Prof. Ascoli erhielt und über die er berichtet. Bei Verwendung geeigneter und richtig hergestellter Sera kann man auch in Organen, die sich im Zustande vorgeschrittener Fäulnis befinden, das Vorhandensein spezifischer Substanzen (Präzipitinogene) nachweisen, die aus dem Protoplasma der Milzbrandbacillen stammen; selbst dann, wenn die mit demselben Material zur Milzbranddiagnose angewendeten bakteriologischen Methoden nur ein negatives Ergebnis hatten“.

In Italien bediente sich jüngst Roncaglio der Thermopräzipitinmethode; er konnte nicht bloß die sicher positiven Resultate von Ascoli, Bierbaum und Pfeiler bestätigen, sondern auch feststellen, daß unter den verschiedenen Organen die Milz dasjenige ist, das sich am besten zu dieser Reaktion eignet. Dieselbe Methode verwendete Zibordi zur Untersuchung der Wirkung verschiedener Konservierungs- und Verwundungsmittel auf das Präzipitinogen; er schloß damit, den Alkohol als das geeignetste Konservierungsmittel für die der Präzipitinprobe zu unterziehenden Organe zu empfehlen. Schließlich erschien in diesen Tagen eine Arbeit von Favero, der sich ebenfalls der angegebenen Methode bediente und die Resultate der angeführten Autoren bestätigt.

Ascoli selbst hat nun angedeutet, daß das in den sicher wirksamen Seris enthaltene Präzipitin des Milzbrandes, wenn es uns auch bei einem echten Milzbrandkeim nicht im Stiche läßt, doch nicht absolut spezifisch ist; die Reaktion tritt zwar bei Extrakten aus Keimen, die dem Milzbrand ferne stehen, nicht auf, wie beim Kochschen Vibrio, dem Bacillus von Shiga, den Keimen der Gruppe Typhus-Coli, Bacillus mesentericus, den Strepto- und Staphylokokken, dem Bacillus des Milzbrandkarbunkels, dem des malignen Oedems, dem Pyocyaneus, Bacillus subtilis, dem des Rotlaufs, des Rotzes etc.; dagegen kann sie bei Extrakten von Pseudomilzbrandbacillen, milzbrandähnlichen oder Bacillus anthracoides mehr oder minder deutlich positiv ausfallen. Dies veranlaßte mich, einige Versuche zu dem Zwecke anzustellen, um zu sehen, ob vielleicht diese nicht-pathogenen Keime, die aus den Faeces, dem Wasser etc. stammen, im Kadaver oder in der entnommenen Milz günstige Bedingungen zu einer reichlichen Vermehrung finden können, so daß die Thermopräzipitinreaktion dann aus diesem Grunde positiv ausfällt.

1) Pick, E., Zur Kenntnis der Immunkörper. (Beitr. z. chem. Phys. u. Pathol. Bd. 1. 1902.)

Zu dieser Idee bin ich auch durch andere, von Ascoli angeführte Daten gelangt; er sah nämlich, daß bei einer Milz von einem Meerschweinchen und einer anderen von einem kleinen Esel, die künstlich infiziert waren, die Präzipitinreaktion negativ ausfiel, wobei die geringe Anzahl der Keime, die man bei der mikroskopischen Untersuchung fand, genügt, um den Mißerfolg zu erklären, zumal im Blute des Esels, das sich als bacillenreicher erwies, die Probe mit dem präzipitierenden Serum deutlich positiv ausfiel. Daraus geht hervor, daß die Intensität der Reaktion mit der Zahl der in den untersuchten Organismus eingedrungenen Milzbrandkeime wächst.

Dieser Forderung entsprechend, stellte ich zwei Reihen von Experimenten an; die erste, um zu sehen, ob unter vollständig künstlichen und abnormen Bedingungen die präzipitierbare Substanz des Pseudomilzbrandbacillus und des *Bacillus anthracoides* in den Organen der Tiere, die mit den genannten Keimen geimpft worden waren, aufgefunden werden kann.

Die zweite sollte jedoch ergeben, ob unter Bedingungen, die den natürlichen ähnlich sind, dieselben Keime, der Pseudomilzbrandbacillus und der *B. anthracoides* die Möglichkeit einer positiven Reaktion ergeben und wie groß diese Möglichkeit ist.

Meine Versuche wurden an Kaninchen und an der Milz von Rindern ausgeführt, die gleich nach Tötung der Tiere entnommen waren; ich bediente mich der Kulturen des Pseudomilzbrandbacillus und des *B. anthracoides* aus der Kollektion Král und des präzipitierenden Serums, das Prof. Ascoli vom Serotherapeutischen Institut in Mailand, an den ich mich wandte, mir mit größter Liebenswürdigkeit zur Verfügung stellte.

Ich habe bei meinen Versuchen die Thermopräzipitinreaktion an normalen Milzen und an solchen, die Pseudomilzbrand- oder milzbrand-ähnliche Keime enthielten, mit präzipitierendem oder normalem Serum ausgeführt; das präzipitierende Serum habe ich an dem Extrakt von Milzen, die von künstlich mit Milzbrand infizierten Meerschweinchen stammten und an einer normalen Kalbsmilz kontrolliert und die einzelnen Resultate sofort, nach 5—10 Minuten notiert.

Das präzipitierende Serum wirkte ausgezeichnet.

#### Erste Versuchsreihe.

**Erster Versuch:** Ein Kaninchen von 1550 g Gewicht erhält am 24. April subkutan die Pseudomilzbrandbacillenkultur einer Platte, suspendiert in 20 ccm physiologischer Kochsalzlösung, injiziert. Am 26. April früh wird es getötet; die Reaktion von Ascoli, an der Milz ausgeführt, ist mit dem präzipitierenden Serum positiv, mit normalem Serum negativ.

**Zweiter Versuch:** Ein Kaninchen von 1700 g erhält am 13. April zwei Plattenkulturen von *B. anthracoides* in 30 ccm physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, subkutan injiziert. Am 16. April früh getötet; Reaktion von Ascoli bei der Milz mit präzipitierendem Serum positiv, mit normalem negativ.

**Dritter Versuch:** Kaninchen von 1270 g erhält am 31. Mai 40 ccm konzentrierten Extrakt von Pseudomilzbrandbacillen in physiologischer Kochsalzlösung intravenös. Es wird gleich getötet; mit dem präzipitierenden Serum zeigt sich die Reaktion bei der Milz angedeutet, positiv ist sie bei dem Herzen; mit normalem Serum negativ.

**Vierter Versuch:** Ein Kaninchen von 1300 g erhält am 31. Mai 25 ccm konzentrierten Extrakt von *B. anthracoides* intravenös und wird gleich getötet; bei der Milz eine sehr schwache Reaktion, beim Herzen positiv mit dem präzipitierenden Serum; mit normalem Serum ist sie negativ.

## Zweite Versuchsreihe. Erste Gruppe.

**Erster Versuch:** In eine Kalbsmilz von 420 g werden am 15. Juni um 12 Uhr Oesen einer Agarkultur von *Pseudomilzbrandbacillen* in 25 ccm physiologischer Kochsalzlösung suspendiert in die Vena splenica injiziert. Die Milz wird bei Laboratoriumstemperatur aufbewahrt; um 7 Uhr abends wird die Reaktion von Ascoli mit negativem Resultat sowohl mit dem präzipitierenden als auch mit dem normalen Serum ausgeführt.

In eine andere Kalbsmilz von 510 g werden am 15. Juni um 12 Uhr ebenfalls 3 Oesen einer Agarkultur von *Bacillus anthracoides*, in 25 ccm einer sterilisierten physiologischen Kochsalzlösung suspendiert, injiziert und sie auch bei Laboratoriumstemperatur aufbewahrt. Um 7 Uhr abends wird die Reaktion von Ascoli mit negativem Resultat mittels präzipitierenden und normalen Serums ausgeführt.

Von jeder der beiden Milzen entnahm ich vor der Einimpfung des *Pseudomilzbrandbacillus* und des *Bacillus anthracoides* ein Stückchen Parenchym, an dem ich die Thermopräzipitinreaktion ausführte; ich erhielt sowohl bei Anwendung von normalem wie auch von präzipitierendem Serum ein negatives Resultat.

**Zweiter Versuch:** Dieselben Milzen wurden, immer bei Zimmertemperatur, bis zum nächsten Tag, dem 16. Juni aufbewahrt, an dem der Versuch mit der Reaktion von Ascoli wiederholt wurde, und zwar wieder mit negativem Resultat in beiden Fällen, sowohl mit präzipitierendem wie auch mit normalem Serum.

**Dritter Versuch:** Am 20. Juni um 11 Uhr werden dem Parenchym einer Kalbsmilz von 480 g 5 Oesen einer Agarkultur von *Pseudomilzbrandbacillen* in 30 ccm physiologischer Kochsalzlösung suspendiert eingepflegt; die Reaktion von Ascoli wird um 8 Uhr abends desselben Tages an der bei Zimmertemperatur aufbewahrten Milz mit negativem Ergebnis mit präzipitierendem wie mit normalem Serum ausgeführt.

Am selben Tag und zur selben Stunde des Vormittags wurden dem Parenchym einer anderen Kalbsmilz von 460 g 5 Oesen einer Agarkultur von *B. anthracoides* in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, eingepflegt. Wie im früheren Fall, wird die Milz bei Zimmertemperatur aufbewahrt und um 8 Uhr abends wird die Thermopräzipitinreaktion an ihr ausgeführt, wobei man mit dem präzipitierenden wie auch mit dem normalen Serum ein negatives Ergebnis erhält. Bezüglich der mit *Pseudomilzbrandbacillen* injizierten Milz muß ich erwähnen, daß die Präzipitinreaktion über 25 Minuten, ja über eine, vielleicht sogar zwei Stunden nach Ausführung des Versuchs negativ blieb; am Morgen des folgenden Tages, also ungefähr 11 Stunden nachher, waren in der bei Laboratoriumstemperatur aufbewahrten Epruvette Spuren einer schwachen Reaktion zu bemerken. Wenn also wirklich eine Reaktion eintrat, so war sie sehr zweifelhaft, eher als negativ anzusehen, weil die endgültige Ablesung nach 15 Minuten, höchstens nach 70 Minuten vorgenommen wird.

Auch bei diesem dritten Versuch wurde die Reaktion von Ascoli auch an normalen Stückchen derselben Milzen vor der Impfung ausgeführt, und zwar sowohl mit präzipitierendem als auch mit normalem Serum und in beiden Fällen mit negativem Resultat.

**Vierter Versuch:** Am Morgen des 21. Juni wurde die Thermopräzipitinreaktion an beiden bei Zimmertemperatur aufbewahrten Milzen mit präzipitierendem wie mit normalem Serum wiederholt und abermals mit negativem Erfolg.

## Zweite Gruppe.

**Erster Versuch:** Ein Kaninchen von 1620 g Gewicht erhält 3 Oesen einer Agarkultur von *Pseudomilzbrandbacillen* in 15 ccm physiologischer Kochsalzlösung suspendiert am 17. Juni um 4 Uhr nachmittags intravenös. Um 5 Uhr desselben Tages wird es getötet und die Reaktion von Ascoli wird an der Milz mit negativem Ergebnis sowohl mittels präzipitierenden als auch mittels normalen Serums ausgeführt.

**Zweiter Versuch:** Ein Kaninchen von 1480 g erhält am 17. Juni um 4 Uhr nachmittags intravenös 3 Oesen einer Agarkultur von *B. anthracoides* in 15 ccm physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Um 5 Uhr desselben Tages wird es getötet und die Reaktion von Ascoli mit negativem Resultat mittels präzipitierenden wie mittels normalen Serums ausgeführt.

**Dritter Versuch:** Ein Kaninchen von 2300 g Gewicht erhält am 18. Juni um 5 Uhr nachmittags intravenös 4 Oesen einer Agarkultur von *B. anthracoides* in 35 ccm physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Um  $\frac{1}{6}$  desselben Tages wird es getötet und bei Zimmertemperatur bis zum folgenden Tag, dem 19. aufbewahrt, an dem um 9 Uhr an der Milz die Thermopräzipitinreaktion ausgeführt wird. Sowohl mit dem präzipitierenden Serum als auch mit dem normalen negatives Resultat.

**Vierter Versuch:** Ein Kaninchen von 2650 g erhält am 18. Juni um 5 Uhr nachmittags 4 Oesen einer Agarkultur von *B. anthracoides* in 35 ccm physiologischer

Kochsalzlösung suspendiert, intravenös. Um  $\frac{1}{8}$  Uhr desselben Tages wird es getötet und bei Zimmertemperatur bis zum Morgen des nächsten Tages, des 19. aufbewahrt, wo um 9 Uhr die Reaktion von Ascoli an der Milz ausgeführt wird. Die erhaltenen Resultate waren bei Anwendung des präzipitierenden wie des normalen Serums negativ.

Fünfter Versuch: Ein Kaninchen von 2800 g erhält am 19. um  $\frac{1}{8}$  Uhr abends intravenös 6 Oesen einer Agarkultur von Pseudomilzbrandbacillen in 30 ccm physiologischer Kochsalzlösung. Es wurde sofort getötet und bei Zimmertemperatur aufbewahrt bis zum folgenden Tage, an dem nach Verlauf von ungefähr 24 Stunden nach dem Tode die Reaktion von Ascoli an der Milz ausgeführt wurde. Diese Reaktion fiel, mit präzipitierendem wie mit normalem Serum angestellt, negativ aus.

Sechster Versuch: Ein Kaninchen von 2860 g erhält intravenös am 19. Juni um  $\frac{1}{8}$  Uhr abends 6 Oesen einer Agarkultur von *B. anthracoides* in 30 ccm physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Wie im vorangehenden Fall, wurde es sofort durch einen Schlag ins Genick getötet und bei Zimmertemperatur aufbewahrt; dann wurde nach Verlauf von ungefähr 24 Stunden nach dem Tode an dem Milzextrakt die Reaktion von Ascoli ausgeführt, die mit dem präzipitierenden wie mit dem normalen Serum negativ ausfiel.

### Dritte Gruppe.

Zu dem Zwecke, um mich soviel als möglich den natürlichen Bedingungen beim Eindringen der Pseudomilzbrand- und milzbrandähnlichen Keime in den Organismus zu nähern, habe ich bei dieser Gruppe von Versuchen 4 Kaninchen einem ungefähr 36-stündigen Fasten unterzogen und hierauf zweien davon per os je 5 Tropfen Krotonöl gegeben, die in ein wenig absolutem Aether gelöst und dann im lauem Wasser emulgiert waren; den beiden andern gab ich hingegen je 15 Tropfen Rizinusöl. Dies geschah in der Absicht, bei den Tieren eine deutliche Reizung der Darmschleimhaut hervorzurufen, die bekanntermaßen die Ueberwanderung der im Darm vorhandenen Keime in den Kreislauf begünstigt.

Erster Versuch: Ein Kaninchen von 2670 g, das seit 96 Stunden fastet, erhält am 16. Juni eine Emulsion von Krotonöl in der angegebenen Dosis und am folgenden Tage um 7 Uhr p. m. in Kleie eine reichliche Aufschwemmung einer Agarkultur von Pseudomilzbrandbacillen. Am 18. früh um 9 Uhr wird ihm noch eine Suspension von Pseudomilzbrandbacillen eingeführt und es dann mit Aether narkotisiert; während der Narkose wird es sezirt. Die Magendarmschleimhaut erscheint intensiv hyperämisch.

Die Narkose wurde ausgeführt, weil sie, wie Saski<sup>1)</sup> gesehen hat, die Ueberchwemmung des Organismus von seiten der Darmflora viel mehr begünstigt. Ich entnahm von der Milz in situ mit einer Pasteurschen Pipette unter genauester Beobachtung aller Regeln der Asepsis ein wenig Pulpa und beschickte damit eine Agarplattenkultur, um zu sehen, ob die im Darm vorhandenen Keime wirklich in die Milz übergewandert waren. Dann habe ich sofort die Reaktion von Ascoli an der heraus genommenen Milz ausgeführt. Die Resultate waren mit dem präzipitierenden und dem normalen Serum negativ. Am folgenden Tag konnte ich konstatieren, daß sich auf den Agarplatten nur wenige Kolonien von *Staphylococcus albus* und nur zwei vom Pseudomilzbrandbacillus entwickelt hatten.

Zweiter Versuch: Einem Kaninchen von 2730 g, das seit 36 Stunden fastet, wird am 16. Juni dieselbe Dosis Krotonölemulsion wie im vorigen Fall eingegeben und am folgenden Tag um 7 Uhr p. m. in Kleie eine Aufschwemmung einer Agarkultur von *B. anthracoides* in physiologischer Kochsalzlösung. Am 18. früh um 9 Uhr wird ihm noch eine Aufschwemmung von *B. anthracoides* eingegeben und es dann mit Aether narkotisiert und in der Narkose sezirt. Die Magendarmschleimhaut zeigte intensive Hyperämie.

Von der Milz wurde, wie im voranstehenden Falle, etwas von der Pulpa aseptisch zur Aussaat auf Agarplatten entnommen und dann mit dem Extrakt desselben Organes die Reaktion von Ascoli ausgeführt. Sie war mit dem präzipitierenden wie mit dem normalen Serum negativ.

Eine der wenigen Kolonien, die sich auf dem Agar entwickelten, war von *Bacillus anthracoides*, die andern vom *Staphylococcus albus*.

Dritter Versuch: Einem Kaninchen von 2360 g, das seit 24 Stunden fastet, wird am 19. Juni um 11 Uhr Rizinusöl in der oben angegebenen Dosis von 15 g eingegeben, und um 8 Uhr abends desselben Tages erhält es in ein wenig Kleie eine starke Suspension einer Agarkultur von Pseudomilzbrandbacillen. Am Morgen des nächsten Tages um 10 Uhr erhält es per os eine starke Emulsion einer Pseudomilzbrandbacillenkultur; es wird um 2 Uhr p. m. desselben Tages durch einen Schlag ins Genick getötet

1) Saski, Ueber anaërobe Mikroben in normalen Körpergeweben. (Bull. Acad. d. Scien. de Cracovie. 1907.)

und bei Zimmertemperatur bis 7 Uhr abends aufbewahrt, zu welcher Zeit es seziert wird. Die Schleimhaut des Dünndarms ist sehr hyperämisch. Von der Milz wird in vitro unter den notwendigen aseptischen Kautelen etwas Pulpa entnommen und damit eine Agarplattenkultur beschickt; dann wird mit dem Extrakt der entnommenen Milz die Thermopräzipitinreaktion mit negativem Resultat mit dem präzipitierenden wie mit dem normalen Serum ausgeführt. In der Kultur haben sich nur wenige Kolonien von *Staphylococcus albus* entwickelt.

Vierter Versuch: Ein Kaninchen von 2570 g, das seit 24 Stunden fastet, erhält am 19. Juni um 11 Uhr per os 15 g Rizinusöl und um 8 Uhr p. m. desselben Tages in ein wenig Kleie eine reichliche Aufschwemmung einer Agarkultur von *B. anthracoides*. Am Morgen des nächsten Tages um 10 Uhr wird ihm nochmals eine reichliche Aufschwemmung einer *B. anthracoides*-Kultur eingegeben; wie das frühere, wird es durch einen Schlag ins Genick getötet und bei Laboratoriumstemperatur bis 7 Uhr p. m. gelassen und dann seziert. Die Dünndarmschleimhaut ist hyperämisch. Von der Milz wird in situ immer mit derselben Technik ein wenig Pulpa entnommen und damit eine Agarplattenkultur beschickt; mit dem Extrakt desselben Organs wird nach der Entnahme die Reaktion von Ascoli mit normalem und mit präzipitierendem Serum ausgeführt und ist in beiden Fällen negativ. Auf der Agarplatte habe ich unter den wenigen Kulturen von *Staphylococcus albus*, die sich entwickelt haben, auch eine Kultur von *B. anthracoides* gefunden.

Wenn man nun die erhaltenen Resultate betrachtet, so findet man als Ergebnis der ersten Versuchsreihe, daß man durch Sättigung des Organismus mit einem Uebermaß von Pseudomilzbrandbacillen oder Anthracoides-Bacillen eine positive Reaktion erzwingen kann; aber diese unter unbedingt abnormen Bedingungen ausgeführten Versuche gestatten uns, die negativen Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe, wo die Untersuchungen unter Bedingungen, die den natürlichen näherstehen, ausgeführt wurden, in dem Sinne auszulegen, daß unter ähnlichen Umständen die Vermehrung der Keime nie einen solchen Grad erreichen kann, der notwendig ist, damit in den Organen genügend präzipitierbares Protoplasma für einen positiven Ausfall der Reaktion vorhanden sei.

Damit erscheint die Richtigkeit der Behauptung Ascolis erwiesen, daß von den Keimen, deren Protoplasma von seinen Seren präzipitiert wird, in der Regel nur der Milzbrandbacillus in solcher Zahl und solchen Verhältnissen in den Organismus eindringen kann, daß er dort durch die Reaktion von Ascoli nachgewiesen werden kann.

#### Literatur.

- Ascoli, A., Der Ausbau der Präzipitinreaktion bei Milzbrand. (Zeitschr. f. Immunitätsforsch. Bd. 10. 1911. H. 3.)
- , La precipitina nella diagnosi del carbonchio ematico. (La Clinica Veterin. 1911. No. 1.)
- , Les précipitines dans la diagnostic du charbon bactérien. (Compt. rendus Soc. de Biol. Séance du 14 février 1911.)
- , Die Präzipitindiagnose bei Milzbrand. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 58. No. 2.)
- , Biologische Milzbranddiagnose mittels der Präzipitinmethode. (Deutsche med. Wochenschr. 1911. No. 8.)
- , Diagnosi del carbonchio ematico col metodo della termoprecipitina. (La Clinica Veterin. 1911. No. 4.)
- , La precipitina del carbonchio ematico. (Pathologica. Anno III. 1911. No. 56.)
- , Il diagnosticatore del carbonchio ematico. (La Clinica Veterin. 1910. No. 9.)
- , Zur Technik meiner Präzipitinreaktion bei Milzbrand. (Berlin. tierärztl. Wochenschrift 1911. No. 22.)

- Ascoli, A., Les précipitines dans le diagnostic du charbon bactérien. (Annal. de méd. vétérin. 1911. No. 6.)
- e Valenti, E., Diagnosi biologica del carbonchio ematico. (Soc. Ital. di Scienz. Nat. seduta 6 Marzo 1910; Biochim. e Terapia Sperim. Anno II. Fasc. 3; La Clinica Veterin. Anno 1910. No. 21.)
- —, Biologische Milzbranddiagnose. (Zeitschr. f. Infektionskrankh. d. Haustiere. Bd. 7. 1910. H. 5/6.)
- Bierbaum, K., Beitrag zur Kenntnis des Milzbrandes mit Hilfe der Präzipitationsmethode. (Berlin. tierärztl. Wochenschr. 1911. No. 12.)
- Pfeiler, W., Die Diagnose des Milzbrandes mit Hilfe der Präzipitationsmethode. (Berlin. tierärztl. Wochenschr. 1911. No. 13.)
- , La diagnosi del carbonchio ematico per mezzo della precipitina. (Il moderno Zooiatro. 1911. No. 4.)
- Roncaglio, G., Sulla specificità della „Reazione Ascoli (termoprecipitina)“ nella diagnosi del carbonchio ematico. (La Clinica Veterin. 1911. No. 10.)
- Zibordi, D., La conservazione del materiale carbonchioso in rapporto alla diagnosi colla „Reazione Ascoli“ (termoprecipitina). (Il Nuovo Ercolani. 1911. No. 16.)
- Favero, Fr., Contributo alla diagnosi del carbonchio ematico colla „Reazione Ascoli“ della termoprecipitina. (La Clinica Veterin. 1911. No. 11.)
- Zibordi, Die Konservierung des Milzbrandmaterials in bezug auf die Diagnose mittel. der Ascolischen Thermopräzipitinreaktion. (Tierärztl. Centralbl. 1911. No. 19.)
- Roncaglio, G., Ueber die Spezifität der Ascolischen Reaktion (Thermopräzipitinsmethode) bei verschiedenen Organen. (Zeitschr. f. Infektionskrankh. d. Haustiere. Bd. 8. 1911. H. 5/6.)

*Nachdruck verboten.*

## Ein kleiner Apparat für die Färbung der Präparate mittels Leishman-Verfahren.

[Hygienisch-parasitologisches Institut der Universität Lausanne.]

Von **B. Galli-Valerio.**

Mit einer Figur.

Die Färbung der Präparate durch die Methode Leishmans gelingt besser und mit geringerem Präzipitat, wenn man während der ganzen Dauer der Färbung die Präparate in leichte Schwingbewegung versetzt. Ist dies aber leicht möglich, wenn man nur einzelne Präparate zu färben hat, so ist es ungemein komplizierter und beschwerlicher, wenn man mehrere Präparate gleichzeitig färben muß. Stellt man die zu färbenden Objektgläser oder Deckgläser auf eine Glasplatte und bringt diese mit beiden Händen in Oszillationsbewegungen, so sind diese Bewegungen immer unregelmäßig und es geht mit diesem Verfahren viel Zeit verloren.

Ich frug mich, ob diese Unannehmlichkeiten nicht beseitigt werden könnten durch einen kleinen Apparat, welcher die gleichzeitige Färbung mehrerer Präparate ermöglichen würde, indem er dieselben in Oszillationsbewegungen versetzt mittels eines Uhrfederwerkes. Da die zu erzielende Bewegung einer Oszillation um eine Zentralachse entspricht, dachte ich daran, bei diesem Apparate dasselbe System anzuwenden, welches mir und Rochaz-de Jongh gute Dienste geleistet hatte zur Untersuchung der Wirkung der Bewegungen des Wassers auf Eier, Larven und Puppen von Culiciden<sup>1)</sup>, d. h. eine Platte, welche in der Mitte einen Stahlzapfen trägt, dessen unteres Ende in ein exzentrisch situiertes Loch einer horizontalen Drehscheibe eingreift.

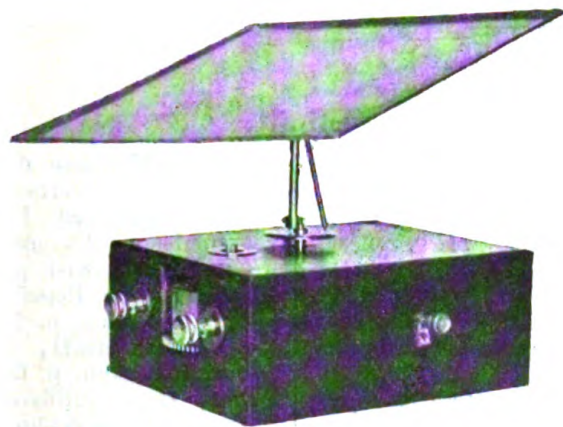
1) Atti d. soc. per gli studi sulla Malaria. Vol. 5. 1903. Manuel pour la lutte contre les moustiques. Lausanne 1906. p. 154.



Nach meinem Wunsch stellte mir Herr Max Hartmann, Uhrmacher und Mechaniker in Lausanne, folgenden kleinen Apparat her, welcher in 2 Teile zerfällt:

- 1) das Laufwerk mit Drehscheibe;
- 2) die Aufnahmeplatte mit Träger und Welle.

Das Laufwerk, ein kräftiges Federzugwerk, ist in ein Hartholzgehäuse ( $13\frac{1}{2}$  cm Länge, 11 cm Breite, 6 cm Höhe) fest verschraubt eingelassen und hat eine Laufzeit von 12—20 Minuten. Durch eine an der oberen Fläche des Kastens angebrachte Oeffnung, wird ein Stahlzapfen mit Vierkant sichtbar, durch welchen mittels eines Schlüssels der Aufzug der Feder bewerkstelligt wird. In der Mitte des Apparates ragt die Verlängerung der Räderwerkswelle empor, welche eine Messingscheibe mit 4 exzentrisch gebohrten Löchern (in verschiedenen Abständen vom Mittelpunkt) trägt. Die seitlich am Kasten angebrachte Schraube dient sowohl zum Ein- und Ausschalten, als auch zum Bremsen zur Verlangsamung der Umdrehung der Scheibe.



Die Platte ( $16 \times 16$  cm für 12 Objektträger), welche die Objektträger aufzunehmen hat, ist in der Mitte mit einem Messingfutter versehen, in welches eine Halbkugel aus hartem Stahl eingeschoben ist. Durch die Kugel sowohl als durch die Welle wird eine dünne Stahlwelle gesteckt, die in einen Zapfen endigt. Durch eine in dem Messingfutter angebrachte Schraube wird die Welle festgestellt. Die quadratische Aufnahmeplatte wird von einem rechtwinkelig gekröpften Träger gehalten, der in einen Messingring endigt, auf welchen die Stahlkugel der Platte zu ruhen kommt. Der Träger selbst ist in jeder beliebigen Höhe festzustellen.

Bei Gebrauch des Apparates wird der besagte Träger resp. dessen Lagerring senkrecht und konzentrisch zur Drehscheibe befestigt; nun wird die Aufnahmeplatte mit Welle in den Ring gelagert, und zwar so, daß der Zapfen in eines der Löcher der Messingscheibe eingreift. Durch Höher- oder Tieferstellung des Trägers kann dann noch der Neigungswinkel der Platte vergrößert oder verkleinert werden. Durch einiges Drehen der Regulierschraube nach rechts wird das Laufwerk eingeschaltet; weiteres nach rechts Drehen setzt die Bremsvorrichtung in Tätigkeit; ganz Herausdrehen nach links stellt das Laufwerk ab.

Um diesen Apparat zu gebrauchen, wird das Laufwerk aufgezogen, die Präparate werden auf die Zinkplatte gestellt, der Apparat wird in Bewegung gesetzt, den Farbstoff läßt man tropfenweise auf die ver-

schiedenen Präparate fallen. Der Apparat wird dann die nötige Zeit in Bewegung gelassen.

Dieser leicht bewegliche und überall aufstellbare Apparat wird jedem, der zahlreiche Präparate nach der Methode Leishmans zu färben hat, gute Dienste leisten. Es braucht kaum gesagt zu werden, daß die Zinkplatte nicht nur Objektträger, sondern auch Deckgläser, und gegebenenfalls auch kleine Gefäße, Farbstoffe enthaltend, welche unausgesetzt in Bewegung erhalten werden müssen, tragen kann.

Lausanne, 7. Juni 1911.

---

*Die Redaktion des „Centralblatts für Bakteriologie und Parasitenkunde“ richtet an die Herren Mitarbeiter die ergebene Bitte, etwaige Wünsche um Lieferung von besonderen Abdrücken ihrer Aufsätze entweder bei der Einsendung der Abhandlungen an die Redaktion auf das Manuskript schreiben zu wollen oder spätestens nach Empfang der ersten Korrekturabzüge direkt an den Verleger, Herrn Gustav Fischer in Jena, gelangen zu lassen.*

---

### Inhalt.

- Bazzola, Carlo**, Contribution à la connaissance des modifications de la résistance des animaux vis-à-vis des microorganismes pathogènes. II. Choléra, p. 133.
- Cardamatis, Jean P.**, Etude biologique et histologique de deux nouveaux Trypanosomes chez un chardonneret de nos pays, p. 98.
- Giurea, Joan**, Ueber Spiroptera strongylina Rud., p. 128.
- Conradi**, Zum Nachweis der Typhusbacillen im Blut, p. 170.
- Cosco, Giuseppe**, Untersuchungen über die Tuberkulose der Milchkühe, p. 59.
- Croner, Fr.**, Beitrag zur Theorie der Desinfektion, p. 175.
- De Gasperi, Federico**, Ueber die Bedeutung der Thermopräzipitinreaktion nach Ascoli für die Diagnose des Milzbrandes. Experimentelle Untersuchungen, p. 184.
- Döhle**, Leukocyteinschlüsse bei Scharlach, p. 63.
- Fermi, Claudio**, Fliegenlarven und Tollwutvirus. Lyssizide Wirkung und Virusübertragung, p. 93.
- Gál, Felix**, Die Rolle der Gärungspilze in der Aetiologie des Typhus, p. 1.
- Galli-Valerio, B.**, Ein kleiner Apparat für die Färbung der Präparate mittels Leishman-Verfahren, p. 190.
- Gonder, Richard**, Untersuchungen über arzneifeste Mikroorganismen. I. Trypanosoma Lewisi, p. 102.
- Kudicke, E.**, Beiträge zur Biologie der Trypanosomen, p. 113.
- Le Blanc, Emil**, Zur Artenfrage der Streptokokken, p. 68.
- Pesci, G.**, Einflüsse der verschiedenen Toxine (Tuberkulin und Tetanustoxin) auf die Lipolyse durch Organe, p. 142.
- Bösler, Karl**, Ueber den Nachweis der Typhusbacillen im Wasser mittels Komplementablenkung, p. 166.
- Bolly, Fr.**, Experimentelle bakteriologische Untersuchungen von verschiedenen Streptokokkenstämmen, p. 86.
- Schern, Kurt**, Ueber Bakterien der Paratyphusgruppe und ihre Beurteilung vom hygienischen Standpunkt, p. 15.
- Stähmer, A.**, Zur Technik der Untersuchung der Lumbalfüssigkeit auf Wassermannsche Reaktion, p. 171.
- Suzuki, Yoshio u. Takaki, Zenso**, Ueber die Beziehung zwischen der v. Pirquet'schen Reaktion und den Tuberkelbacillen im Blut, p. 149.
- Wills, Fred. F.**, The relationship of the acid-fast bacilli, p. 37.

# Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 61. Heft 3.

Ausgegeben am 9. Dezember 1911.

*Nachdruck verboten.*

## Zur Kenntnis des Dimorphismus von *Trypanosoma gambiense* (var. *rhodesiense*).

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Amsterdam  
(Vorstand: Prof. Dr. R. H. Saltet).]

Von Dr. N. H. Swellengrebel, Privatdozenten.

Mit 9 Figuren.

### 1. Einleitung.

Seit den klassischen Untersuchungen Schaudinns (1904), der für *Trypanosoma noctuae* und *Leucocytozoon ziemanni* die Existenz männlicher, weiblicher und indifferenter Trypanosomen nachwies, hat man sich vielfach bemüht, einen solchen sexuellen Trimorphismus auch bei anderen Trypanosomen nachzuweisen. Ich werde mich bei der Literaturbesprechung auf jene Untersuchungen beschränken, welche man in dieser Beziehung an *Trypanosoma gambiense* angestellt hat.

Minchin (1908) wies nach, daß es im Blute des Wirtes zwei Formen von *T. gambiense* gibt, eine schlanke und eine kurze, breite Form mit kurzem, freiem Flagellum. (Diese letztere Form wird in dieser Arbeit von nun an mit dem Namen „Dickes *Trypanosoma*“ bezeichnet werden.) S. Moore und Breinl (1907) verneinten zwar diesen Dimorphismus, aber Minchin (1908), Bruce (1910) und Hindle (1910) zeigten aufs deutlichste, daß *T. gambiense* und *T. brucei* wirklich unter zwei Formen im Blute der Säugetiere vorkommen. Nach Stephens und Fantham ist bei *T. rhodesiense* dieser Polymorphismus sehr stark ausgesprochen.

Es ist jetzt die Frage zu beantworten, ob dieser Dimorphismus auch sexueller Natur sei. Kleine und Taute (1911) haben während der Entwicklung von *T. gambiense* im Darm von *Glossina palpalis* männliche und weibliche Formen nachgewiesen. Bruce (1911), der ebenfalls diese Entwicklung studierte, hält die schlanken (männlichen) Formen für Degenerationsprodukte; eine Befruchtung oder sonst einen Sexualakt konnte er nicht nachweisen. Die Entwicklung verlief augenscheinlich asexuell.

Begreiflicherweise haben solche negative Befunde nur beschränkten Wert; es bleibt dabei der auffallende Dimorphismus, der so ungezwungen als eine sexuelle Differenzierung anzusehen ist, völlig unerklärt.

Es fanden sich auch Forscher, deren Auffassung dahin ging, die schlanken und dicken Trypanosomen als die Extreme einer kontinuierlichen Variation anzusehen. Diese Forscher konnten also die schlanken und breiten Formen nicht als eigene Typen auffassen.

Dieser Meinung ist neuerdings Hindle (1910) entgegengetreten. Von Blut, das reichlich Trypanosomen enthielt, stellte dieser Forscher ein Präparat her (Trockenfixierung — Giemsa-Färbung). Sodann zeichnete er 1000 Trypanosomen aus der Mitte des Präparates (mit dem Zeichenprisma). Die Länge der Zellen wurde gemessen (vom Hinter-

ende bis zur Spitze der Geißel) und auch die maximale Breite. Wenn man die Längenmaße graphisch darstellte, so daß auf die Abszissenachse die Maße eingetragen wurden und auf die Ordinatenachse die Zahlen von Trypanosomen gleicher Länge, so erhielt man nicht eine regelmäßige Galton-Kurve, sondern eine Kurve mit drei Spitzen, welche Trypanosomen repräsentierten, die 21  $\mu$ , 29  $\mu$  und 35  $\mu$  lang waren. Eine solche dreispitzige Kurve konnte konstruiert werden, wenn man den Quotienten:  $\frac{\text{Länge}}{\text{Breite}}$  in derselben Weise graphisch darstellte. Hindle schließt mit den Worten, daß diese dreispitzigen Kurven unzweideutig die Existenz von drei Typen bei *T. gambiense* beweisen.

Es wäre Hindles Beweisführung tatsächlich entscheidend, wenn er sich nicht bei seiner Untersuchung auf ein einziges Präparat beschränkt hätte. Die Trypanosomen aus diesem einzigen Präparate konnten kaum ein genaues Bild der Sachlage geben, da sie alle unter genau den gleichen äußeren Bedingungen gesammelt waren, Bedingungen, die vielleicht nur für einen Teil der Trypanosomen günstig waren.

Es schien mir also wünschenswert, Hindles Untersuchungen nachzuprüfen und womöglich zu erweitern, um so zu einer Erklärung des Polymorphismus von *T. gambiense* zu gelangen.

## 2. Material und Methoden.

Wie gesagt, benutzte Hindle die trockne Fixierung; er gibt an, daß diese die äußeren Konturen der Trypanosomen besser konserviere als die feuchte Fixierung. Diese Behauptung ist an sich, trotz der vielen warnenden Stimmen gegen die alte Methode, nicht unwahrscheinlich, habe ich doch selbst (1910) gezeigt, daß die Form von *T. lewisi* bei der trocknen Alkoholfixierung besser oder mindestens ebensogut erhalten bleibt, wie bei der feuchten Fixierung. Doch war es bei dieser Untersuchung, wo es auf genaue Längen- und Breitenmaße ankam, angebracht, die Fixierungsmethode zu verwenden, welche die natürlichen Dimensionen aufs beste erhielt.

Es wurden dazu die Trypanosomen in Blutausrichen getrocknet, nachher in Alkohol fixiert und nach Giemsa gefärbt, oder die Fixierung geschah feucht in Schaudinns Sublimatgemisch mit nachheriger Alkohohlärtung und Heidenhain-Färbung, endlich wurden die Trypanosomen nach der kürzlich von Bruce (1910) angegebenen Methode fixiert und gefärbt (Fixierung in Dämpfen von Osmium-Eisessig: 45 Sekunden, Nachhärtung in Alkohol  $\frac{1}{2}$  Stunde, Giemsa-Färbung).

Die Messung der Trypanosomen geschah in folgender Weise: Die Flagellaten wurden bei einer Vergrößerung von etwa 2250 Diam. (Zeiss-Apochromat, Oelimmersion 2 mm, Kompens.-Okular No. 18) auf der Höhe des Mikroskopfußes mit Hilfe der Zeiss'schen Kamera gezeichnet (1 mm entspricht dann 0,28  $\mu$ ). Die Messung der Länge der so erhaltenen Figuren geschah nicht der Längsachse des Körpers entlang, wie man dieses gewöhnlich tut. Die mathematische Längsachse ist, zumal bei den breiteren und den gekrümmten Individuen, nicht genau festzustellen, und die Messung einer aufs Geratewohl gezogenen Längsachse kann unter Umständen zu nicht unbeträchtlichen Fehlern Anlaß geben. Ich habe daher die Länge immer der Geißel entlang gemessen, und zwar wurde das hintere Ende immer in einer geraden Linie von der Geißelbasis zur hinteren Zellenspitze gemessen. Dies hat auch den



Vorteil, daß dadurch einem weiteren Unterschiede zwischen den dicken und schlanken Trypanosomen Rechnung getragen wird; die ersteren haben nämlich im allgemeinen eine viel weniger stark gewellte Geißel, wie die letzteren.

Die Breite wurde in einer Ebene gemessen, welche senkrecht auf die Mitte der Längsachse des Kernes orientiert ist.

Die Messung der Länge geschah mittels eines Kurvimeters, welches die Länge bis zu 0,5 mm (also bis zu 0,14  $\mu$ ) genau angab, es geschah dieses in derselben Weise, wie es Hindle nach Nuttalls Angaben getan hat.

Wenn man in dieser Weise 10 nach den drei verschiedenen Methoden präparierte Trypanosomen mißt, erhält man folgende Zahlen (Tabelle I):

Tabelle I.

Trockenfixierung		Sublimatfixierung		Osmiumfixierung	
Länge	Breite	Länge	Breite	Länge	Breite
<b>33,1</b>	1,2	<b>30,2</b>	1,7	30,8	1,3
31,6	1,0	27,7	<b>0,8</b>	19,6	<b>2,2</b>
25,8	<b>0,8</b>	29,4	1,5	22,4	<b>0,8</b>
25,8	1,0	29,1	0,8	28,0	1,1
32,8	1,1	<b>22,7</b>	2,8	32,5	1,0
30,8	1,0	27,1	0,8	<b>40,3</b>	1,0
28,0	1,0	28,0	0,8	18,8	1,7
26,6	2,0	29,9	<b>2,5</b>	26,0	1,0
23,8	2,5	28,9	0,8	24,6	2,0
<b>20,2</b>	<b>2,8</b>	28,0	1,1	32,2	1,1

NB. Die maximalen und minimalen Längen- und Breitenmaße sind fett gedruckt, die Maße in  $\mu$  ausgedrückt.

Wie aus dieser Tabelle zu ersehen ist, weichen die Maße der nach den drei Methoden fixierten Trypanosomen nur unwesentlich voneinander ab. Nur bei der Osmiumfixierung fand sich ein längeres Exemplar vor, als es bei den 10 in Alkohol oder Sublimat fixierten Trypanosomen aufgefunden worden war. Dies ist jedoch nur Zufall, da man solche lange Exemplare auch bei den letzten Kategorien auffinden konnte. Das lange Exemplar in den feucht mit Osmium-Essigsäure fixierten Präparaten zeigt aber, daß lange Flagellaten keine Kunstprodukte der trocknen Fixierung sind, eine Meinung, welche der Referent von Hindles Arbeit im „Bull. of the Sleeping Sickness Bureau“, No. 24, zu hegen scheint.

Es geht also aus dieser Untersuchung hervor, daß man zu den biometrischen Studien an *T. gambiense*, ohne Fehler zu machen, die Methode der trocknen Fixierung mit nachfolgender Giemsa-Färbung verwenden kann.

### 3. Biometrische Studien an *Trypanosoma gambiense* (var. *rhodesiense*).

Ein Meerschweinchen, das am 17. X. 1910 mit einem Stamme von *T. gambiense* aus London (School of tropical Medicine)<sup>1)</sup> geimpft wurde, zeigte am 29. X. zuerst Trypanosomen im Blute. Von da an

1) Die Trypanosomen stammten von einem Schlafkranken aus dem Tale der Luangua, wo man bekanntlich zuerst *T. rhodesiense* auffand. Durch ihr morphologisches Verhalten erwiesen sie sich zu dieser Varietät gehörig.

(12. Tag der Infektion) wurden jeden Tag Präparate hergestellt bis zum 17. XI. (29. Tag der Infektion), wo sich keine Trypanosomen mehr vorfanden; am 25. XI. traten diese wiederum auf und hielten sich bis zum Tode des Tieres am 4. XII. Während dieser Zeit wurden wiederum täglich Präparate gemacht. Von 16 dieser Präparate, die während der Zeit vom 31. X. bis 15. XI. und 25. XI. bis 28. XI. hergestellt waren, wurden je 100 Zellen (also zusammen 1600 Zellen) in der angegebenen Weise gezeichnet und gemessen. Es muß ausdrücklich bemerkt werden, daß nur solche Trypanosomen berücksichtigt wurden, die keinerlei Zeichen einer Zweiteilung aufwiesen. Fig. 1 und 2 geben die Resultate dieser Messungen in graphischer Darstellung.

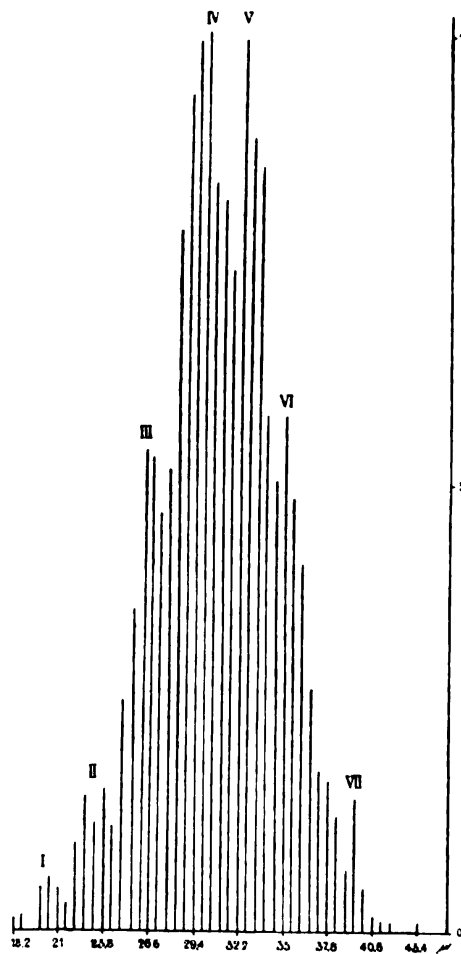


Fig. 1.

Fig. 1. Die Längenmaße sind auf die Abzissenachse eingetragen, die Zahlen der Trypanosomen gleicher Länge auf die Ordinatenachse.

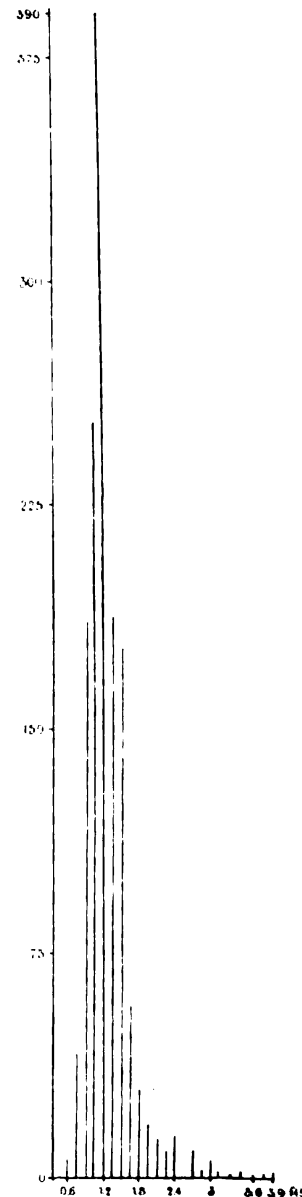


Fig. 2.

Fig. 2. Die Breitenmaße sind auf die Abzissenachse eingetragen, die Zahlen der Trypanosomen gleicher Breite auf die Ordinatenachse.

Außerdem wurde von jedem Trypanosoma der Quotient  $\frac{\text{Länge}}{\text{Breite}}$  aufgestellt, im Anschluß an Hindles Arbeit. Obwohl ich glaube,

daß es nicht ganz zulässig ist, dieser Quotientenkurve denselben Wert wie einer Galton-Kurve beizumessen, will ich mich dennoch in dieser Hinsicht an Hindles Arbeit anlehnen, um besser vergleichbare Resultate zu bekommen. Fig. 3 zeigt die graphische Darstellung dieser Quotienten.

Betrachten wir zunächst die 3 Kurven für sich und im Vergleiche mit Hindles Kurven.

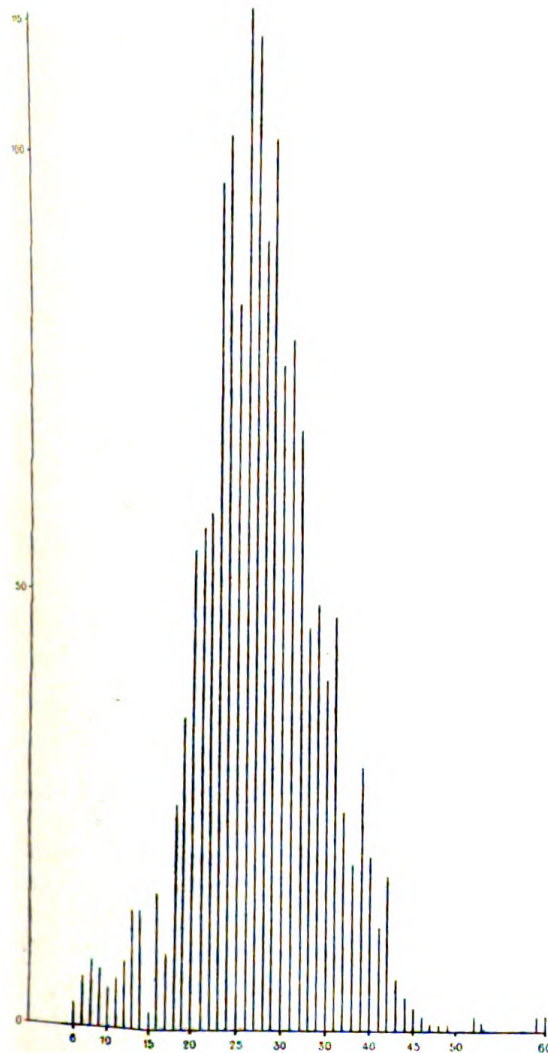


Fig. 3.

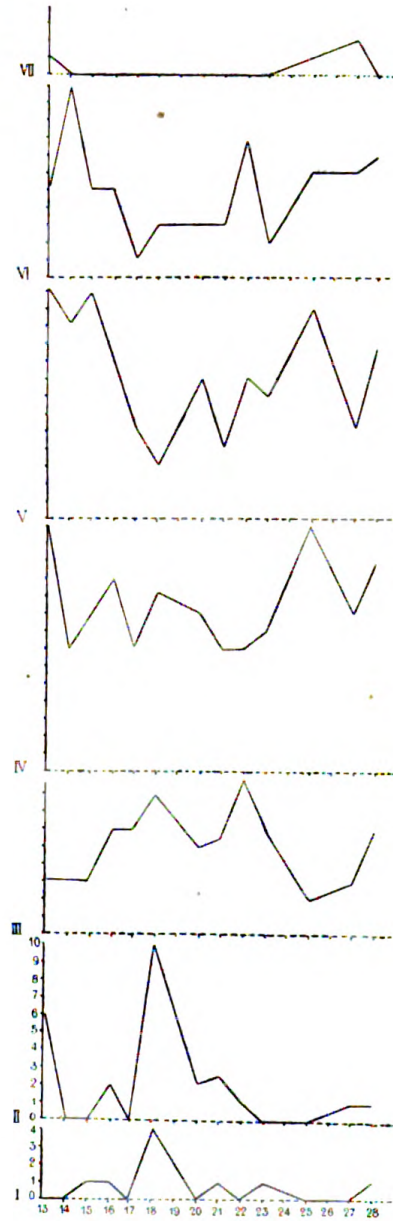


Fig. 4.

Fig. 3. Die Quotienten sind auf die Abszissenachse eingetragen, die Zahlen der Trypanosomen gleicher Quotienten auf die Ordinatenachse.

Fig. 4. Graphische Darstellung der Frequenz der Typen I—VII während der Zeit vom 31. Oktober bis 15. November 1910. Die Tage der Infektion sind auf die Abszissenachse eingetragen, die Frequenz der Typen auf die Ordinatenachse.

1) Die Längenkurve. Diese ist eine ziemlich regelmäßige Galton-Kurve, zwar mit nicht unbeträchtlichen Lücken, die darauf hindeuten könnten, daß man es hier mit zwei oder mehr ineinander geschobenen Kurven zu tun habe. Hindles Kurve ist deutlich drei-



gipfelig, die Gipfel sind bei 21  $\mu$ , 30  $\mu$  und 34,5  $\mu$  gelegen. Wenn man in meiner Kurve jede Unregelmäßigkeit in Betracht zieht, kann man 7 Gipfel unterscheiden, entsprechend Trypanosomen von 21, 23,5, 26,9, 29,4, 31,9, 35 und 39,5  $\mu$  Länge. Gipfel I, IV und VI meiner Kurve stimmen also mit den 3 überein, die Hindle beobachtete. Da nun diese Gipfel nicht bedeutender sind, wie die 4 übrigen, muß man, wenn man mit Hindle die Trypanosomen mit Längen von 21, 30 und 35  $\mu$  als eigene Typen anerkennen will, das gleiche tun mit den Trypanosomen von den Typen II, III, V und VII. Da die Kurve zur weiteren Lösung dieser Frage nicht behilflich sein kann, habe ich zuerst die Frequenz dieser 7 Trypanosomen während der Infektion erforscht (d. h. den Prozentsatz, der den verschiedenen Typen entsprechenden Trypanosomen). Tabelle II gibt darüber Auskunft.

Tabelle II.

Tag der Infektion	Frequenz der Typen in Prozenten						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
13	0	6	3	14	13	5	1
14	0	0	3	7	11	11	0
15	1	0	3	9	13	5	0
16	1	2	6	12	8	5	0
17	0	0	6	7	5	1	0
18	4	10	8	10	3	3	0
20	0	2	5	9	8	3	0
21	1	3	6	7	4	3	0
22	0	1	9	7	8	8	0
23	1	0	6	8	7	2	0
25	0	0	2	14	12	6	1
27	0	1	3	9	5	6	2
28	1	1	6	11	10	7	0

Da diese Tabelle auf den ersten Blick wenig übersichtlich erscheint, habe ich die Frequenzen in Fig. 4 graphisch dargestellt.

Man ersieht aus diesen Kurven, daß die Schwankungen der Frequenz vom Typus I und II dieselben sind. Beide zeigen ein Maximum am 18. Tage der Infektion. Typus II zeigt überdies eine erhöhte Frequenz am 13. Tage, diese kommt aber daher, weil in Typus II nicht nur dicke Trypanosomen untergebracht sind, sondern auch kurze, schlanke Formen, die bei der zu dieser Zeit häufigen inäqualen Längsteilung gebildet werden und nichts mit den dicken Formen zu tun haben. Es finden sich solche Formen in beschränktem Maße auch in Typus I.

Typus IV—VII haben Kurven, die im allgemeinen miteinander übereinstimmen. Zu Anfang der Beobachtungsperiode ist eine erhöhte Frequenz da, am 18. Tage der Infektion oder etwas später sind aber die Repräsentanten dieser Typen weniger zahlreich, um am Ende der Beobachtungsperiode (welche durch das gänzliche Verschwinden der Trypanosomen abgeschlossen wird) wieder an Zahl zuzunehmen.

Typus III zeigt ein abweichendes Verhalten. Zwar gibt es hier auch die drei Maxima, das erste Maximum ist aber gerade an jener Stelle gelegen, wo die anderen Kurven ihr Minimum haben (am 18. Tage), oder jedenfalls im Herabsteigen begriffen sind. Diese Unregelmäßigkeit kommt aber davon her, daß im Typus III noch dicke Trypanosomen vorkommen, die gerade am 18. Tage am häufigsten sind.

Hieraus ist also ersichtlich, daß nur die Typen I und II eine Sonderstellung einnehmen und zusammen mit einem Teile der Repräsentanten von Typus III als ein besonderer Typus zu betrachten wären.

2. Die Breitenkurve. Diese ist eine vollständige Galton-Kurve, die nur nach rechts hin etwas weniger steil wie nach links heruntersteigt. Nur da könnte man also Trypanosomen eines fremdartigen Typus erwarten, die aber in so geringer Zahl vorhanden sind, daß nur ein kleiner Gipfel (Trypanosomen von  $2,4 \mu$  Dicke entsprechend) gebildet wird. Dieser Typus wäre also von sehr breiten Zellen ( $2-4 \mu$  dick) repräsentiert. Von einem Trimorphismus findet sich keine Spur; vielleicht wären hier aber 2 Typen zu unterscheiden mit mittleren Breiten von  $1,2$  und  $2,4 \mu$ . Wenn wir von diesen mutmaßlichen Typen wiederum die Frequenz während der Periode vom 31. X. bis 15. XI. 1910 graphisch darstellen, so erhalten wir die auf Fig. 5 abgebildeten Kurven.

Man sieht, daß die Schwankungen der Frequenz der Typen  $a^4$  und  $a^8$  sich nicht gegenseitig decken. Die Frequenzkurve  $a^8$  hat ihr Maximum am 18. Tage der Infektion, während die Kurve  $a^4$  trotz der vielen täglichen Schwankungen fast immer auf gleicher Höhe bleibt. Kurve  $a^8$  stimmt mit den Längsenkurven I und II überein, Kurve  $a^4$  nur insofern mit den Längsenkurven IV—VII, daß auch hier der niedrigste Punkt am 18. Tage der Infektion erreicht wird.

3. Die Quotientenkurve. Hindles Quotientenkurve ist deutlich dreigipfelig mit Maximis 10, 22 und 27. Wie aus Fig. 3 zu ersehen, ist meine Kurve eine ziemlich regelmäßige Galton-Kurve mit dem Gipfel bei 26. Zwar gibt es kleinere Lücken bei 25 und 28, aber diese sind so unbedeutend, daß sie keine nähere Berücksichtigung rechtfertigen. Nach rechts hin verläuft die Kurve regelmäßig, nicht so aber nach links zwischen 6 und 15; hier findet man die kleinsten, von kurzen und breiten Trypanosomen gelieferten Quotienten. Aus den schon angegebenen Gründen werde ich mich enthalten, auf Grund von an dieser Kurve angestellten Betrachtungen irgendwelche Schlüsse zu ziehen, nur sei darauf hingewiesen, daß hier, wie bei der Längsenkurve, die 3 deutlichen Gipfel Hindles nicht aufzufinden sind.

Wir sehen also, daß gewisse Gründe vorliegen, die Trypanosomen mit einer Länge unter 24 und jene mit einer Breite über  $2 \mu$  als eigene Typen anzusehen. Es fragt sich noch, ob die dicken Trypanosomen auch die kurzen sind, d. h. ob die Längstypen I und II identisch mit den

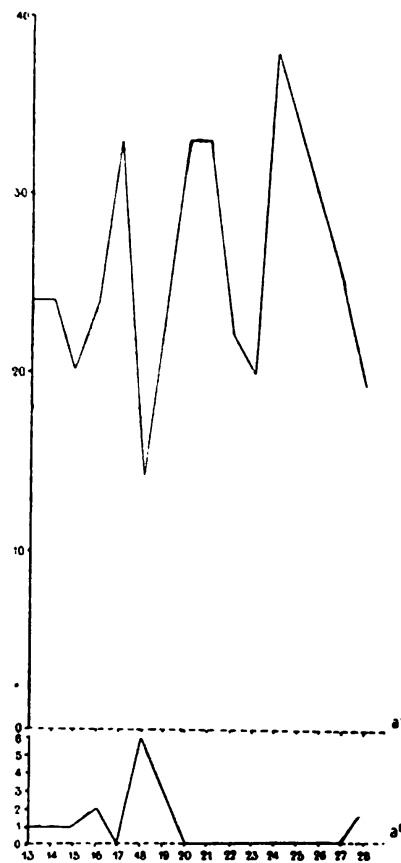


Fig. 5. Graphische Darstellung der Frequenz der Breitentypen  $a^4$  ( $1,2 \mu$ ) und  $a^8$  ( $2,4 \mu$ ) von dem 13. bis zum 28. Tage der Infektion. Die Daten sind auf die Abszissenachse eingetragen, die Frequenz auf die Ordinatenachse.

Trypanosomen, die über  $2\ \mu$  breit sind? Folgende Tabelle (III), welche die Breitenmaße der Repräsentanten der 7 Längstypen anführt, gibt hierüber Auskunft:

Tabelle III.

Typus	Länge in $\mu$	Prozentsatz der Trypanosomen, welche in jedem Typus eine Breite (in $\mu$ ) haben von:																							Prozentsatz von Breiten über 1,95 $\mu$ in jedem Typus
		0,6	0,75	0,9	1,05	1,2	1,35	1,5	1,65	1,8	1,95	2,1	2,25	2,4	2,55	2,7	2,85	3,0	3,15	3,3	3,45	3,6	3,75	3,9	
I	21,0	—	—	1	—	1	—	—	1	—	—	1	1	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	57
II	23,5	—	2	2	4	6	—	—	1	2	2	1	—	1	—	3	—	—	1	1	—	—	1	2	34
III	26,9	1	2	14	15	18	6	6	—	3	2	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3
IV	29,4	1	1	20	28	39	12	11	2	2	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
V	31,9	—	3	10	20	34	18	10	5	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
VI	35,0	—	—	8	10	22	12	7	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	2
VII	39,5	—	—	—	1	2	4	2	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	9

Wir ersehen aus dieser Tabelle, daß nur die Trypanosomen mit einer Länge unter  $24\ \mu$  (Typen I und II) einen höheren Prozentsatz an breiteren Formen aufweisen (57 und 34 Proz.). Der niedrigere Prozentsatz beim Typus II ist die Folge von dem schon erwähnten häufigeren Vorkommen von kleinen, aus inäqualer Teilung hervorgegangenen Trypanosomen innerhalb dieser Gruppe. Typus III zeigt eine etwas höhere Zahl breiter Formen als die Typen IV—VI; dieses stimmt mit dem ebenfalls erwähnten Vorkommen von dicken Trypanosomen, welche, wie man sich erinnern wird, auch die Frequenzkurve dieses Typus störte, überein. Nur Typus VII zeigt einen ziemlich hohen Prozentsatz breiter Formen (9 Proz.); diese sehr langen und zu gleicher Zeit breiten Trypanosomen stimmen aber so sehr mit jenen überein, welche im Anfange einer Längsteilung stehen, daß ich nicht zögere, die Repräsentanten dieses Typus als larvierte Teilungsformen anzusehen.

Es ergibt sich also aus dieser Tabelle, daß von den Trypanosomen mit einer Breite über  $2\ \mu$  die meisten den Längstypen I und II angehören.

Eine übersichtliche Illustration von Tabelle III gibt Fig. 6, welche die am häufigsten vorkommenden Repräsentanten der 7 Längstypen vorstellt. Man sieht, daß die „dicken“ Trypanosomen nur den Typen I und II (und in beschränktem Maße auch noch dem Typus III) angehören. Zwischen den Typen IV—VI ist kein merklicher Unterschied. Typus VII mit den großen, breiten Trypanosomen stellt, wie gesagt, höchstwahrscheinlich Formen vor, die sich bald teilen werden. Das Vorkommen von schlanken Trypanosomen in den Typen I und II wurde schon erwähnt.

Fassen wir das Resultat dieser langwierigen Untersuchungen zusammen, so kommen wir zu dem Schlusse, daß die „dicken“ Trypanosomen wahrscheinlich nicht ein Extrem einer kontinuierlichen Variation vorstellen, sondern einen eigenen Typus bilden. Außer diesem Typus konnten aber keine anderen aufgefunden werden.

#### 4. Bedeutung der „dicken“ Trypanosomen<sup>1)</sup>.

Da ich es, wie ich glaube, wenigstens wahrscheinlich gemacht habe, daß die dicken Trypanosomen eine eigene Kategorie bilden, so

<sup>1)</sup> Unter „dicken“ Trypanosomen verstehe ich von jetzt an solche mit einer Breite über  $2\ \mu$  und einer Länge (der Geißel entlang gemessen) unter  $24\ \mu$ .

fragt es sich jetzt, welche Bedeutung diese Formen haben. Um hierüber einigen Anhalt zu gewinnen, wurde der Prozentsatz dieser Art von *Trypanosomen* täglich mit der Teilungsfrequenz (d. h. mit dem Prozent-

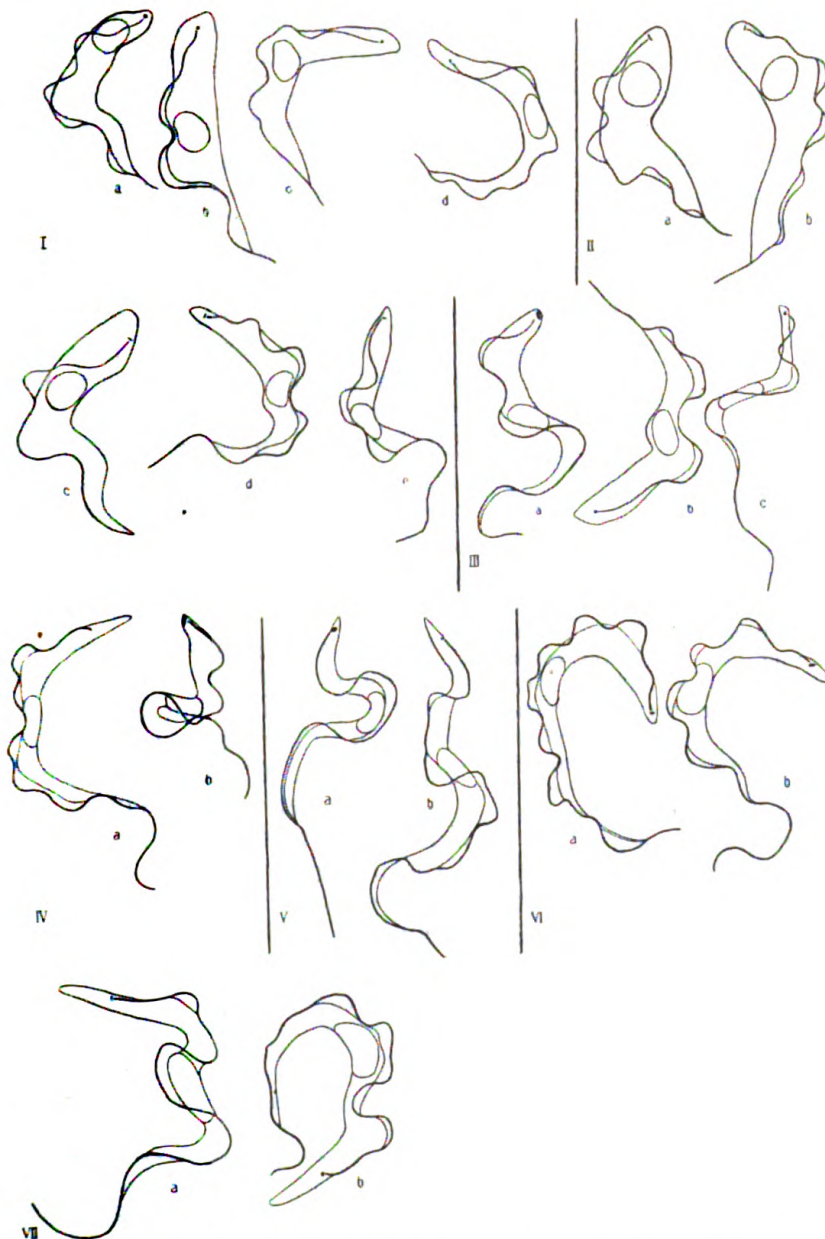


Fig. 6. Repräsentanten der 7 Längentypen. Typus I: a—c „dicke“ *Trypanosomen*, d schlankes, kurzes *Trypanosoma*, eben aus einer Teilung hervorgegangen. Typus II: a—c „dicke“ *Trypanosomen*, d—e wie bei Typus I d. Typus III: a, c schlanke *Trypanosomen*, b dickes *Trypanosoma*. Typus VII: a, b *Trypanosomen* kurz vor der Teilung.

satze der sich teilenden Zellen) verglichen. Die graphische Darstellung in Fig. 7 gibt hierüber Auskunft.

Wie ersichtlich, gibt es einen gewissen Parallelismus zwischen den beiden Kurven; die punktierte Linie erreicht ihre Maxima immer etwas später als die durchgezogene; es scheint, als ob eine erhöhte Teilungs-

fähigkeit ein massenhaftes Auftreten dicker Trypanosomen nach sich zieht. Jedenfalls geht aus diesen Beobachtungen hervor, daß die dicken Trypanosomen nicht als Degenerationsprodukte aufzufassen sind, da sie gerade zu Anfang der Infektion am häufigsten sind. Auch bringt diese Beobachtung keine Stütze für die Behauptung, daß die dicken

Trypanosomen weibliche Gameten seien, welche man, in Analogie mit den Plasmodien, am Ende der Infektion erwarten würde.

Da die Infektion beim Meerschweinchen keine weiteren Gesichtspunkte eröffnete, habe ich untersucht, ob die Infektion von Mäusen mit *T. gambiense* var. *rhodesiense* etwas mehr Licht auf die Bedeutung der dicken Trypanosomen werfen würde.

Bekanntlich verläuft die Infektion bei Mäusen in etwa einer Woche tödlich. Am ersten oder zweiten Tage nach der Bluteinspritzung sind die Trypanosomen schon unschwer nachzuweisen. Während der Krankheit sind im Blute neben den schlanken Formen auch dicke Trypanosomen zu beobachten. Die äußere Form dieser Gebilde ist die gleiche wie beim Meerschweinchen, sie sind aber sehr reich an Volutin-granula (wie überhaupt diese Trypanosomen in der Maus reicher an Granula sind wie im Meerschweinchen und ihr Protoplasma ist viel tiefer blau gefärbt (nach Giemsa) wie jenes der dicken Trypanosomen im Meerschweinchen. Auch das Verhältnis zwischen Teilungsfrequenz und Frequenz der dicken Trypanosomen ist ein anderes im Blute der Maus. Tabelle IV gibt hierüber nähere Auskunft:

Fig. 7. Graphische Darstellung der Teilungsfrequenz (durchgezogene Linie) und des Prozentsatzes der dicken Trypanosomen (punktirierte Linie) während der Dauer der Infektion eines Meerschweinchens. Die Lücke in den Kurven bedeutet die trypanosomenfreie Periode. Die Tage der Infektion sind auf die Abszissenachse eingetragen, die Prozente (dicker Trypanosomen bzw. sich teilender Trypanosomen) auf die Ordinatenachse.

färbt (nach Giemsa) wie jenes der dicken Trypanosomen im Meerschweinchen. Auch das Verhältnis zwischen Teilungsfrequenz und Frequenz der dicken Trypanosomen ist ein anderes im Blute der Maus. Tabelle IV gibt hierüber nähere Auskunft:

Tabelle IV.

Weißer Maus, am 3. Oktober 1910 geimpft mit *T. gambiense* var. *rhodesiense* aus Meerschweinchen, tot am 11. Oktober 1910.

Tag der Infektion	Teilungsfrequenz	Frequenz dicker Trypanosomen
4	25	0
5	33	4
6	30	3
7	24	5
8	16	9
9	0	90

Wir sehen also, daß hier die Frequenz der dicken Formen zunimmt, zugleich mit dem Abklingen der Teilungsfrequenz. Das letzte Präparat, das einige Stunden nach dem Tode der Maus hergestellt wurde,



zeigte unter den noch intakten Trypanosomen fast ausschließlich dicke Formen. Hier könnte man also an Degeneration denken; dem ist aber nicht so, denn die kurzen Trypanosomen werden am Ende der Infektion nur darum relativ so zahlreich, weil sie eben die einzigen sind, die nicht so schnell degenerieren. Das post mortem hergestellte Präparat zeigte eine große Zahl degenerierter Trypanosomen, das Plasma war ganz oder fast ganz geschwunden, nur der Kern, mit etwas Plasma umgeben, und die Geißel waren noch sichtbar (Fig. 8d und c). So weit die Formen noch zu erkennen waren, gehörten diese degenerierten Trypanosomen durchweg dem schlanken Typus an. Nur die dicken dunkelblauen Trypanosomen waren noch gänzlich intakt (Fig. 8a), teilweise

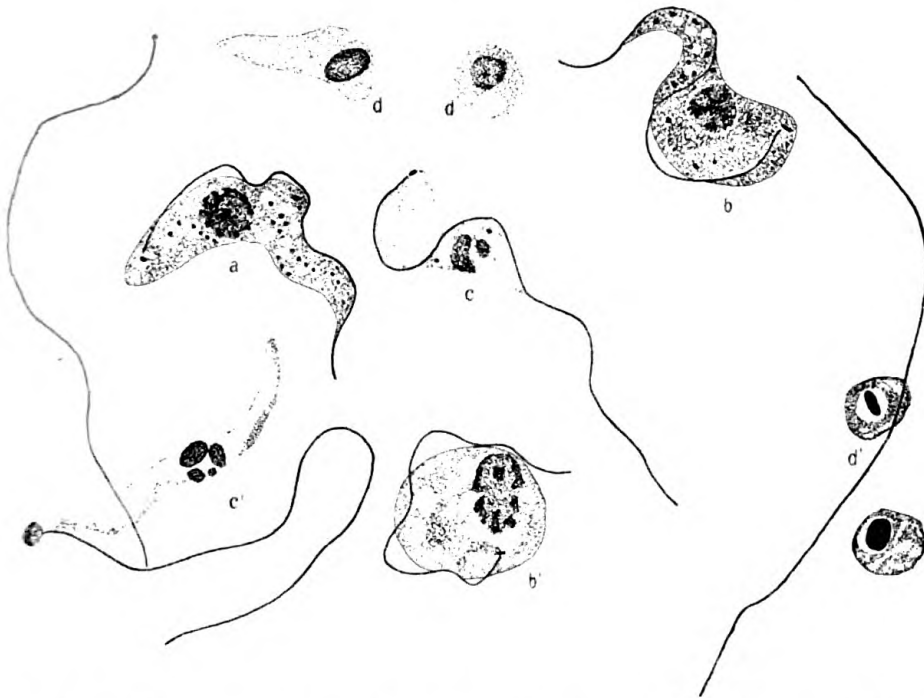


Fig. 8<sup>1</sup>). Trypanosomen aus dem Blute einer gestorbenen Maus. a Dickes Trypanosoma. Plasma dunkelblau, reich an Volutingranula. b Dasselbe, fängt an, sich zu runden. b' Abgerundetes, dickes Trypanosoma (Kern in Teilung). c Degenerierte, schlanke Trypanosomen, Plasma kaum färbbar. c' Wie c, nur hat sich hier der Ueberrest vom Plasma von der Geißel losgelöst. dd Ueberreste von Protoplasma degenerierter Trypanosomen mit Kern, aber ohne Blepharoplast. d' Wie d, aber nach feuchter Sublimatfixierung und Heidenhain-Färbung. Kern geschrumpft, in einer Vakuole gelegen, täuscht zumal in der linken Zelle ein Karyosom vor.

hatten sie zwar eine rundliche Gestalt angenommen (Fig. 8b), doch waren Protoplasma, Kern, Blepharoplast und Geißel noch immer gut färbbar und im ungefärbten Präparate zeigten sich diese Gebilde noch beweglich.

1) Die Bilder, welche die degenerierten Trypanosomen in Fig. 8 cc', dd' aufweisen, zeigen große Uebereinstimmung mit den „Latent bodies“ von Moore und Breinl (1907). Fantham (1910) hat neuerdings die Existenz dieser Gebilde erwiesen, doch glaube ich, daß Moore und Breinl jedenfalls teilweise als „Latent bodies“ degenerierte Reste von Trypanosomen beschrieben haben.



Es zeigen sich also die dicken Trypanosomen in der Maus als besonders lebenskräftige Individuen, die ungünstigen äußeren Umstände (Tod des Wirtes) besser als die schlanken Trypanosomen widerstehen können. Dieses stimmt also gut mit den Befunden am Meerschweinchen überein, wo wir ja gesehen haben, daß die dicken Formen im Zeitpunkt lebhaftester Teilung gebildet werden. Warum die dicken Trypanosomen im Meerschweinchen nachher wieder verschwinden und am Ende der Infektion nicht mehr zu finden sind, weiß ich nicht. Vielleicht ist das Meerschweinchen kein geeigneter Wirt für *T. gambiense* var. *rhodesiense*. Die öfters zu beobachtende Tatsache, daß nach dem Tode eines mit *T. gambiense* var. *rhodesiense* infizierten Meerschweinchens die Trypanosomen fast plötzlich alle verschwunden sind, läßt sich vielleicht dadurch erklären, daß die dicken, resistenten Formen nicht vorhanden sind und die anderen Trypanosomen den nach dem Tode des Wirtes auftretenden ungünstigen Bedingungen nicht zu widerstehen vermögen.

Gut in Uebereinstimmung mit letzterwähnter Tatsache des Zusammenhangs des schnellen Verschwindens aus dem Blute bei Mangel an dicken Trypanosomen ist der Einfluß, welchen Atoxyl auf die Trypanosomen ausübt (5 mg Atoxyl bei einer Maus von 40 g). Atoxyl scheint speziell auf die dicken Formen einzuwirken; jedenfalls sind sie in den Atoxylmäusen viel seltener, als in den unbehandelten Mäusen. Wenn man dabei bedenkt, wie schnell Atoxyl die Trypanosomen zum Schwinden bringt, so liegt die Vermutung auf der Hand, daß dieses Medikament eben darum so prompt wirkt, weil es zuerst den lebensfähigsten Teil der Trypanosomen vernichtet<sup>1)</sup>.

##### 5. Uebereinstimmung der dicken und runden Formen von *T. gambiense* aus der Maus mit Entwicklungsstadien aus *Glossina palpalis*.

Es haben diese Studien über die Resistenz der kurzen Trypanosomen Interesse in Verbindung mit den neuesten Untersuchungen von Kleine und Taute (1911) und von Bruce mit seinen Mitarbeitern (1911) über die Entwicklung von *T. gambiense* in *Glossina palpalis*.

Kleine und Taute fanden im Anfange der Entwicklung normale Trypanosomen und daneben typische, dicke Trypanosomen mit dunkelblau gefärbtem Protoplasma. Im Darne und im Proventriculus fanden sich sodann runde Formen vor, die gänzlich mit jenen runden Formen übereinstimmen, die ich im Blute der toten Mäuse fand und die daselbst von den dicken Trypanosomen gebildet wurden. Später fanden sich nur noch letztere Formen vor, daneben aber auch crithidienähnliche Flagellaten mit großem Kerne. Zuletzt traten wieder normale Trypanosomen auf. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die dicken Formen sich im Darne von *Glossina* wie in der toten Maus am widerstandsfähig-

1) Man sei bei der Beurteilung der Blutpräparate mit Atoxyl behandelter Mäuse vorsichtig. Es treten dabei Gebilde auf, die dicke Trypanosomen vortäuschen, nur ist das Plasma nicht blau gefärbt und die Geißel ist meist länger. Neben solchen Formen findet man auch dicke Formen in Teilung. Ich halte diese dicken Atoxyl-Trypanosomen für Anfangsstadien einer Teilung, die unter dem Einflusse des Giftes langsamer verläuft. Mit den dicken, dunkelblauen Trypanosomen aus dem Blute der Maus haben sie nichts zu tun, sie treten eben auf, wenn die letzteren verschwinden.

sten zeigten, und daß so ihr vorwiegendes Auftreten zu Anfang der Entwicklung zu erklären ist.

Bruce und seine Mitarbeiter scheinen viele der Entwicklungsstadien Kleines und Tautes als Degenerationsprodukte anzusehen; sie fanden aber in den Speicheldrüsen typische, dicke und auch körnchenreiche, runde Trypanosomen, die zuletzt die normale Form wiederum annehmen.

Es scheinen also die dicken und die runden Trypanosomen bei der Entwicklung im vertebraten Wirte eine bedeutende Rolle zu spielen; dieses wird durch ihre größere Resistenz äußeren Umständen gegenüber gewährleistet. Eigentlich kann man das Auftreten dieser Formen nicht als eine Entwicklung ansehen; es ist nur ein Ueberleben von schon im Blute präformierten Trypanosomen. Dieses gilt natürlich nicht von den Crithidien, die von den genannten Forschern beschrieben wurden, welchen aber Bruce und seine Mitarbeiter für die Entwicklung keine Bedeutung beimessen.

## 6. Morphologische Unterschiede zwischen *T. gambiense* und *T. rhodesiense*.

Neuerdings haben Stephens und Fantham (1910) als eine neue Art oder wenigstens Varietät ein *Trypanosoma* beschrieben, das sie *T. rhodesiense* nennen und das bei einem Schlafkranken aus NO.-Rhodesia gefunden wurde. Dieses *Trypanosoma* unterscheidet sich von *T. gambiense* durch die Lage des Kernes, welcher ganz im Hinterende der Zelle zu finden ist; bisweilen liegt der Blepharoplast neben oder selbst vor dem Kerne. Die Forscher geben an, daß weder sie selbst, noch irgendeiner ihrer Vorgänger je solche Gebilde bei Stämmen von *T. gambiense* gesehen haben.

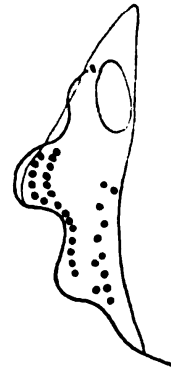


Fig. 9. Rhodesiense-artiges *Trypanosoma* aus dem Blute einer infizierten Maus.

Ich kann die Angaben dieser Forscher völlig bestätigen, wie aus Fig. 9 zu ersehen. Es ist zu bemerken, daß *T. gambiense* var. *rhodesiense* für das Studium des Polymorphismus besonders günstig erschien, weil letzterer hier so besonders ausgeprägt ist.

## 7. Zusammenfassung.

Es ist nach den hier erörterten biometrischen Untersuchungen wahrscheinlich, daß bei *T. gambiense* var. *rhodesiense* ein merklicher Dimorphismus vorkommt (schlanke und dicke Formen). Ein Trimorphismus wurde aber nicht beobachtet, und die diesbezüglichen Angaben Hindles konnten nicht bestätigt werden. Der Grund dieser Strittigkeit der Resultate ist zu erklären einmal durch die Tatsache, daß Hindle und ich nicht mit demselben Stamme arbeiteten (H. gibt die Herkunft seiner Trypanosomen leider nicht an), sodann durch die Tatsache, daß H. weniger (1000) Trypanosomen gemessen hat als ich (1600), weiter durch

die ungleiche Methode des Messens (wenn aber ein Trimorphismus wirklich existierte, würden meine Maße das ebensogut ans Licht gebracht haben) und endlich dadurch, daß H. nur Trypanosomen eines einzigen Präparates untersuchte, während ich diese Flagellaten während einer längeren Periode beobachtete.

Die dicken Formen (nicht länger als  $24\ \mu$  und breiter als  $2\ \mu$ ) sind resistenter gegen ungünstige Einflüsse wie die schlanken Formen, was zumal bei der Maus kurz nach dem Tode deutlich hervortritt. Unter dem Einflusse ungünstiger Bedingungen nehmen sie vielfach eine runde Gestalt an. Solche Formen stimmen vollkommen mit einigen der Entwicklungsstadien von *T. gambiense* in *Glossina palpalis* überein.

Bei Tieren, welche nur wenige dicke Trypanosomen im Blute aufweisen, und das nur zu Anfang der Krankheit (Meerschweinchen), findet man dieses Ueberleben der dicken Formen nach dem Tode nicht, dieses geht mit einem sehr schnellen post mortalen Verschwinden der Trypanosomen Hand in Hand.

Atoxyl verhindert das Auftreten der dicken Trypanosomen; mit dieser Tatsache hängt wohl das rasche Verschwinden dieser Flagellaten bei einer Atoxylbehandlung zusammen.

Ob die dicken Trypanosomen weibliche Gameten sind, entscheidet meine Untersuchung nicht; sicher wird man aber in Zukunft beim Suchen eines sexuellen Zyklus gut tun, die dicken Formen aufs genaueste zu beachten.

#### Literatur.

- Bruce, Hamerton, Bateman and Mackie, Trypanosome diseases of domestic animals in Uganda. II. *Trypanosoma brucei*. (Proc. Roy. Society. Vol. 561. 1910. p. 1.)  
 Dieselben, Further researches on the development of *T. gambiense* in *Glossina palpalis*. (Ebenda. Vol. 567. 1911. p. 513.)  
 Hindle, A biometric study of *Trypanosoma gambiense*. (Parasitology. Vol. 3. 1910. p. 455.)  
 Kleine und Taute, Trypanosomenstudien. (Sonderabdr. a. Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. 31. 1911. No. 1.)  
 Minchin, Investigations of the development of Trypanosomes in Tsetse-flies and other Diptera. (Quart. Journ. microsc. Sc. Vol. 52. 1908. p. 159.)  
 —, Notes on the polymorphism of *T. gambiense*. (Parasitology. Vol. 1. 1908. p. 236.)  
 Moore and Breinl, The cytology of the Trypanosomes. Part I. (Annals of trop. Med. and Parasitol. Vol. 1. 1907. p. 441.)  
 Stephens and Fantham, On the peculiar morphology of a Trypanosome, etc. (Proc. Roy. Soc. Vol. 83. 1910. p. 29.)  
 Swellengrebel, Fixation and staining of *T. lewisi*. (Parasitology. Vol. 3. 1910. p. 226.)

*Nachdruck verboten.*

## Weitere Studien über Choleravibrionen. Ueber das Verhalten der aus der Epidemie in Arabien 1908 stammenden Choleravibrionen bei der Agglutination mit nieder- wertigem Serum<sup>1)</sup>.

[Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institut in Wien  
(Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf).]

Von Prof. **R. Kraus**, Dr. **J. Hammerschmidt**, k. k. Bezirksarzt  
und Dr. **Zeky Zia** (Konstantinopel).

Allgemein gilt als feststehend, daß im biologischen Verhalten der Choleravibrionen bei der Agglutination mit hochwertigem Serum Unterschiede nicht nachweisbar sind.

Tabelle I.

Kultur	Ser. Aeg. I	Aeg. 8	Pfeiffer	Hankin	Wert d. Ser.
Pfeiffer, Hankin		Pfeiffer, Hankin, Aeg. 2, 3, El Tor, Messina	Hankin	Hankin	10 000 (20 000)
Aeg. 1, 2, Messina		Aeg. 6, 7, 9, 11, 15	Pfeiffer		5 000
Aeg. 7, 8, 9, 15, 20, 21, El Tor I, Moucha		Aeg. 17, 18, 21	Moucha	Pfeiffer, Messina	2 000
Aeg. 3, 6, 13, 17, 18, 19			Aeg. 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 15, 17, —21, Mess., El Tor	Aeg. 1—3, 6—9, 11, 15, 17—21, El Tor, Moucha	1 000

Und doch finden wir bei der Durchsicht der Literatur Befunde vor, welche diesem Satze widersprechen. In der bekannten Arbeit von Kollé, Gotschlich, Hetsch, Lentz und Otto<sup>2)</sup> liegen Versuche vor, welche

1) Vorgetragen am Mikrobiologentag in Dresden, Juni 1911.

2) Zeitschr. f. Hyg. Bd. 44.

Tabelle II. (Kolle, Gotschlich.)

	Kult. Aeg. 3	Aeg. 2	Messina	El Tor I
10 000				
5 000				
2 000				
1 000				
Serum	Pfeiffer, Aeg. 2, 3, Aeg. 8 Hank., 7, 13, 9 Aeg. 1, 18, 19, 17, 20, 21, Moucha El T. I	Pfeif- Aeg. 6, 20, Aeg. 1, 3, Aeg. 8, 9 fer, Hank., 7, 11, 13, 8, 9 Aeg. 15, 17, El T. I Moucha sina	Pfeif-Hank. Aeg. 1, 2, Aeg. 8 fer Aeg. 3, 6, 7, 9, 13, 8 11, 15, 17, 20 Messina El T. I	Pfeif- Aeg. 1, 11, Aeg. 8 fer, 13, 17, 18, 2, 3, 8 Hank., 19, 20, 21, 7, 9 Aeg. 6, El T. I

zeigen, daß ein hochwertiges Choleraserum verschiedene Cholerastämme in ganz verschiedenen Werten zu agglutinieren vermag.

Zunächst sehen wir aus den Tabellen von Gotschlich, Kolle und ihren Mitarbeitern<sup>1)</sup>, daß ein Serum, gewonnen mit einem Stamm, verschiedene Cholerastämme in verschiedenen Werten beeinflusst (Tab. I). Sera, welche noch in Verdünnungen von 1:10 000 einzelne Stämme komplett agglutinieren können, agglutinieren andere Stämme nur in Verdünnungen 1:5000, 1:2000 und 1:1000. Auch die Tab. II zeigt uns, daß ein und dasselbe Serum, z. B. Aegypten 1 und 17, den Choleravibrio Aegypten 13 nur 1000-fach agglutiniert, dagegen andere Choleravibrio, Aegypten 2, Messina, El Tor 1 bis zu 2 und 5000-facher Verdünnung. Das Serum Aegypten 20 und 21 agglutiniert den Stamm Aegypten 3 bis 1000-fach, den Stamm Aegypten 2, El Tor 2000-fach und den Stamm Messina 5000-fach. (Irgendeine Gesetzmäßigkeit läßt sich aus den Tabellen nicht ableiten, weder in bezug auf Provenienz, Verschiedenheit in der Agglutinabilität, noch Alter der Vibrionen etc.)

Würde man ähnlichen Verhältnissen, wie sie von Gotschlich, Kolle und ihren Mitarbeitern beschrieben sind, in der Gruppe des Typhus und typhusähnlichen Bakterien begegnen, so würde man die in Verdünnung 1:1000 agglutinierten Bakterien mit denjenigen, welche noch in 10 000-facher Verdünnung komplett agglutinieren, nicht als identisch ansehen. Gotschlich und Kolle haben aber diese Verhältnisse nicht weiter berücksichtigt und auch keine weiteren Schlußfolgerungen gezogen.

In unserer Arbeit (Kraus und Pribram)<sup>2)</sup> „Ueber Choleravibrionen und andere pathogene Vibrionen“ sahen wir, daß auch die spezifischen El Tor-Stämme (Gotschlich) agglutinatorisch sich verschieden verhielten. Diese Differenz, die allerdings mit hochwertigem Serum nicht ermittelt werden konnte, ließ sich mit niederwertigem Serum zweifellos nachweisen. So agglutinierte beispielsweise ein Serum, gewonnen mit El Tor-Stamm III, einzelne El Tor- und Cholerastämme bis 1:1000, andere El Tor-Stämme nur bis 500 oder 200.

Haendel und Woithe<sup>3)</sup> geben auch an, daß ein 10 000-fach agglutinierendes Serum den Cholerastamm Baku 1:3000 und Cholerastamm 3 nur in der 1000-fachen Verdünnung agglutiniert. Durch Passage wurde die Agglutinierbarkeit dieser Stämme gesteigert, jedoch nur vorübergehend. In jüngster Zeit hat Horowitz<sup>4)</sup> analoge Beobachtungen gemacht.

Die hier vorgebrachten Tatsachen aus der Literatur und eigene neuere Beobachtungen über Verschiedenheit der Toxine der Choleravibrionen haben uns veranlaßt, das Verhalten der aus verschiedenen Epidemien stammenden Choleravibrionen in ihrem agglutinatorischen Verhalten des näheren noch einmal zu untersuchen.

Daß hochwertige Sera Unterschiede im agglutinatorischen Ver-

1) Die Resultate verschiedener Tabellen haben wir der Uebersichtlichkeit wegen in einzelne Tabellen zusammengefaßt und haben nur die Choleravibrionen aufgenommen.

2) Centralbl. f. Bakt. 1906.

3) Arbeiten aus d. Kais. Gesundheitsamte. Bd. 48.

4) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 58.



halten der Choleravibrionen aufweisen können, zeigen zur Evidenz die erwähnten Versuche von Gotschlich und Kollé.

In der angeführten Arbeit (Kraus und Pribram) sind jedoch Anhaltspunkte dafür gegeben, daß solche Unterschiede zutage treten, wenn nur niederwertige Sera benützt werden.

Die folgenden Versuche sind mit niederwertigem Serum von Kaninchen und Ziegen angestellt.

Es wurden Choleravibrionen aus verschiedenen Epidemien der verschiedenen Länder benützt und mit einzelnen dieser Vibrionen wurden Sera gewonnen.

1) Aus der Tab. III geht zunächst hervor, daß ein Serum, gewonnen mit einem Stamm Behrend (sporadische Fälle Spandau<sup>1)</sup> 1910), die Spandauer Stämme Behrend, Sarnow gleich hoch agglutiniert wie die österreichischen sporadischen Stämme Gasslhuber, Held (Wien) den ungarischen Stamm Erczi, die El Tor-Stämme 2, 4, 6, Stamm Moskau (Berestnew) und Stamm Kamaran<sup>2)</sup> 1908 2. Niedriger als diese Stämme werden agglutiniert Stamm El Tor V 1:50 komplett und Stamm Saratow, Kamaran 3, 6, 14, nur fast komplett.

Tabelle III. Kan. 355 (Behrend).

	El Tor a Moskau	El Tor 6, 2, Gasslh., Beh- rend, Sarnow	El Tor 4 Erczi, Held, Kam. 2	El T. V	Z. 10	Sarat. Kam. 6, 3, 14	El T. V, Schurup. Kam. 15, 10
300							
200							
100							
50							

Gar nicht wurden von diesem Serum agglutiniert Stamm Schurupow (Rußland) Kamaran 15, 10, El Tor V.

1) Diese Stämme verdanken wir Herrn Prof. Lentz in Berlin.

2) Die Kamaranstämme wurden uns von Herrn Dr. Delpino freundlichst überlassen und sind in der Epidemie 1908 gezüchtet worden.

2) Serum, gewonnen mit El Tor-Vibrio V (Wien<sup>1)</sup>) (Tab. IV), zeigte ein ähnliches Verhalten, insofern nicht nur El Tor-Vibrionen, sondern auch die Stämme Gasslhuber, Sarnow, Konstantinopel (1910), Charkow (1910) fast gleiches agglutinatorisches Verhalten aufweisen, im Gegensatz zu den **Kamaranstämmen** 10, 14, 15, die nicht agglutiniert wurden.

Tabelle IV. Kan. 481 (El Tor V).

	Chark. 1910	El T. II	El T. V B	El T. V W	Gasslh. Konst. I, II	El T. I	El T. V H	El T. VI	Chark. 2910	Sarat.	Kam. 3	Kam. 2	Kam. 10	14	15
600															
400															
200															
100															
												P	θ	θ	θ

3) Das Serum gewonnen mit Stamm Kamaran 10 (Tab. V) agglutiniert alle Kamaranstämmen 10, am höchsten dann Stamm 2 und 3, 15, 14. Der Choleravibrio Moskau, El Tor, Hamburg und Schurupow werden ebenfalls agglutiniert, jedoch nicht so hoch wie Kamaranstämmen. Dagegen werden nicht agglutiniert die Stämme Gasslh., Hoffmann (Wien 1910), Jelinek (Brünn 1910), Göny, Erczi (Ungarn 1910), Behrend, Sarnow (Spandau 1910), die El Tor-Stämme 5 Wien, Berlin, Hamburg 1 und Charkow 1910).

In den früheren Versuchen haben die Sera, gewonnen mit Stamm Behrend, El Tor, die Kamaranstämmen nicht agglutiniert. Serum, gewonnen mit einem Kamaranstamm, agglutiniert Kamaranstämmen, einzelne russische Stämme (Moskau, Schurupow), einen El Tor-Stamm und läßt die europäischen und russischen Cholerastämme 1910 und auch El Tor-Stämme unbeeinflusst. Wieder also der Gegensatz zwischen den Kamaranstämmen 1908 und den anderen Choleravibrionen und El Tor-Vibrionen.

1) Die El Torstämme Wien und Berlin sind identisch. Der eine Stamm V wurde in Wien bei 37° fortgezüchtet, der andere im Reichsgesundheitsamt.

Tabelle V. Kan. 193 (Kam. 10).

	Kam. 10	Kam. 2	Mosk.	El T. V	Kam. 14	Kam. 3	Schur.	Kam. 15	El T. VI Z. 30 Chark. 2490	Bes- ser	Gasslh., Behr., Erczi, Sarat., Hoffm., Göny, Je- linek, El T. V, Wien, Berlin, I Hamburg, Chark. 2416, 78, 2150
300											
200											
100											
50										P	θ

Nach diesen eindeutigen Versuchen war es nicht wahrscheinlich, daß diese hier zutage tretenden Differenzen etwa durch die individuellen Verhältnisse der Kaninchensera bedingt sein dürften. Immerhin haben wir noch Versuche mit agglutinierenden Seris von Ziegen durchgeführt.

Es wurden Ziegen mit Filtraten von Bouillonkulturen verschiedener Choleravibrionen vorbehandelt und ebenso wie in den früheren Versuchen alle Stämme zu den Versuchen verwendet.

In Tab. VI sehen wir, daß Serum, gewonnen mit Stamm Sarnow und Behrend (Spandau 1910), die Stämme Gasslh., Jelinek, Göny, Erczi in 1000—800-facher Verdünnung ebenso agglutiniert wie ältere Stämme Saigon k und Stamm Pfeiffer. In der Verschiedenheit der Agglutinabilität der Stämme dürfen also die hier zutage tretenden Unterschiede nicht gesucht werden. Wenn die frischen Stämme allein eine Sonderstellung zeigen würden oder alle Stämme, könnte selbstverständlich kein weiterer Schluß gezogen werden. Wissen wir doch aus neueren Versuchen (Kraus und Müller, Haendel und Woithe), daß gerade frische Stämme eine erhöhte Agglutinabilität aufweisen können als ältere Laboratoriumsstämme.

Wiederum werden von diesem 800—1000-fachen Serum Kamaranstämmen 15, 16 nicht agglutiniert, andere Kama-

Tabelle VI. Ziege 31 (Serum Sarnow, Behrend). 1. Aderlaß.

	Erczi	Jelinek	Gony	Saigon k	Besser	Pfeiffer	Saigon $\alpha$	Sarat.	Kam. 15	Kam. 16
	Ung. 1910									
1000										
800										
600										
400										
200										

## 2. Aderlaß.

	Gasslh.	Konst. II	Kam. VI	Kam. II	Kam. III	Kam. XV	Kam. XIV	Kam. X.
1000								
800								
600								
400								
200								

ranstämme 6, 2, 3, 14, 15 nur in 100-facher komplett oder fast komplett.

Auch das Serum, welches mit Filtraten aus Stämmen Charkow 1910 gewonnen ist, agglutiniert in 800-facher Verdünnung Stämme Gasslh., Konstantinopel, El Tor 4, dagegen Kamaranstämme 14, 15 nur fast komplett in 100-facher Verdünnung und Stamm 10 gar nicht.

Aber auch Serum, gewonnen mit El Tor-Stämmen I, V und II, V verhält sich ähnlich (Tab. VII). Stämme Gasslh., Konstantinopel werden in 400-facher Verdünnung agglutiniert und die Kamaranstämme entweder gar nicht oder fast komplett in 200-facher Verdünnung. Daraus ist wieder das prinzipiell verschiedene Verhalten der Kamaranstämme gegenüber anderen Choleravibrien aus anderen Epidemien mit Ausnahme einzelner Stämme aus Rußland zu ersehen.

Tabelle VII. Ziege (El Tor).

	Ser. 3 (El T. 1 u. V)						Ser. 48 (El T. II u. V)					
	Kam. 10	Kam. 15	Kam. 14	El T. IV	Gsslh.	Konst. II	Kam. 10	Kam. 14	Kam. 15	El T. IV	Konst. II	Gsslh.
1600												
800												
400												
200	0	0					0					

Diese Unterschiede ließen sich zur vollen Evidenz erweisen mit einem Serum, welches mit Stamm Kamaran 2 (Filtrat) gewonnen ist (Tab. VIII). Das Serum agglutiniert in 800, 600-facher Verdünnung Kamaran 2, 4 bis 200-fach 6 und 15, Kamaran 3 fast komplett bis 400-fach, und andere Stämme wie El Tor, Saigon, Pfeiffer, Besserew, Z 10 (Rußland 1908), Hoffmann, Göny, Jelinek, Erczi (1910) Behrend, Sarnow in 200-facher Verdünnung gar nicht. Der russische Stamm Saratow 4 wird in 600-facher Verdünnung agglutiniert.



Tabelle VIII. Ziege 35 (Kamaran 2).

	Kam. 2	Sarat. 4	Kam. 6	Kam. 15	Kam. 3	El T. IV	Saig. L	Saig. k	Besser	Pfeif- fer	Z. 10	Hoffm. Gony Jelin.	Sarat. Behrend Gassih. Erczi
1000													
800													
600													
400													
200						Sp	Sp	p	Sp	P	θ	p	θ

Zusammengefaßt lassen diese Versuchsreihen mit **niederwertigem** (200—1000-fachem) Serum die Annahme zu, daß die aus der Epidemie in Arabien 1908 gezüchteten Kamaranstämme agglutinatorisch von den El Tor-Stämmen und Stämmen aus den Cholerafällen 1910 in Deutschland, Wien, Ungarn, Konstantinopel, Charkow zu unterscheiden sind.

Wenn wir nun für diese Tatsachen eine Erklärung geben sollen, können wir zunächst die Annahme einer Verschiedenheit der Agglutinabilität verschiedenaltiger Stämme ausschließen, da z. B. die Saigonstämme oder der Stamm Cholera Pfeiffer sich ebenso verhalten wie die frischen Stämme 1910. Dazu kommt noch, daß gleichaltrige Stämme aus Rußland 1908 sich ebenso wie frische Stämme (1910) verhalten. Mit dieser Annahme ist auch unvereinbar, daß mit Kamaranstämmen ein Serum gewonnen wird, welches auf Kamaranstämme wirkt und für die frischen Cholerastämme fast wirkungslos ist.

Es bliebe demnach nur die Annahme zu erörtern, ob nicht etwa besondere Agglutinine als Ursache für die hier gewonnenen Befunde heranzuziehen wären.

Um diese Möglichkeit zu prüfen, haben wir Absättigungsversuche angestellt, deren Resultate im folgenden wiedergegeben sind.



Es wurde zu diesem Zwecke ein agglutinierendes Serum mit lebenden Agarkulturen der Kamaranstämmen so weit abgesättigt, bis das Serum kein Agglutinin mehr für den zur Absättigung verwendeten Stamm enthielt. Dieses Serum wurde dann in verschiedenen Verdünnungen auf die anderen Kamaranstämmen und Cholerastämme geprüft.

Tabelle IX.

Agglutinationsversuch mit abgesättigtem Norbert(El Tor)-Serum (Pferd) (1 ccm Serum + 2 Kulturen 6 St. bei 37° zentrifugiert und abpipettiert).

Cholerastämme		Mit Kamaran 3 abgesättigtes Serum					
		200	400	800	1200	1600	2000
Kamaran 3	1 St.	θ	θ	θ	θ	θ	θ
	15 „	θ	θ	θ	θ	θ	θ
Kamaran 6	1 „	θ	θ	θ	θ	θ	θ
	15 „	θ	θ	θ	θ	θ	θ
Gasslhuber	1 „	fk.	Prt.	Prt.	Sp.	θ	θ
	15 „	k.	fk.	fk.	Prt.	θ	θ
Konstantinopel I	1 „	fk.	Prt.	Prt.	Sp.	θ	θ
	15 „	k.	fk.	Prt.	Prt.	Sp.	Sp.
Konstantinopel IV	1 „	fk.	fk.	Prt.	Prt.	Sp.	θ
	15 „	k.	k.	Prt.	Prt.	θ	θ
Kamaran 2	1 „	Prt.	θ	θ	θ	θ	θ
	15 „	Prt.	Sp.	θ	θ	θ	θ
Kamaran 10	1 „	θ	θ	θ	θ	θ	θ
	15 „	Sp.	Sp.	θ	θ	θ	θ
El Tor 2	1 „	Sp.	θ	θ	θ	θ	θ
	15 „	k.	fk.	fk.	Prt.	Sp.	Sp.
El Tor 4	1 „	θ	θ	θ	θ	θ	θ
	15 „	k.	k.	fk.	Prt.	Prt.	Prt.

In Tab. IX sehen wir, daß nach Absättigung des Serums mit Stamm Kamaran 3 die Kamaranstämmen 3 und 6 gar nicht, 2 und 10 in 200-facher Verdünnung fast gar nicht agglutiniert werden; andere Stämme, Gasslhuber, Konstantinopel und El Tor-Stämme, werden in 200-facher und 400-facher Verdünnung des Serums noch komplett agglutiniert.

Tabelle X.

Agglutinationsuntersuchungen mit abgesättigtem Norbert-Serum (1 ccm Serum + 2 Agarkulturen 6 St. bei 37° zentrifugiert und abpipettiert).

Cholera- stämme	Mit Kamaran 10 abgesättigtes Norbert-Serum								Mit Kamaran 14 abgesättigtes Norbert-Serum								Mit El Tor 4 abgesättigtes Norbert-Serum							
	200		400		600		1000		200		400		600		1000		200		400		600		1000	
	1 St.	15 St.	1 St.	15 St.	1 St.	15 St.	1 St.	15 St.	1 St.	15 St.	1 St.	15 St.	1 St.	15 St.	1 St.	15 St.	1 St.	15 St.	1 St.	15 St.	1 St.	15 St.	1 St.	15 St.
Kamaran 10	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ
Kamaran 14	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ
El Tor 4	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ
Kamaran 2	Sp.	fk.	Sp.	Sp.	θ	Sp.	θ	θ	Prt.	fk.	θ	Sp.	θ	θ	θ	θ	Prt.	Prt.	Sp.	Sp.	θ	θ	θ	θ
Kamaran 3	Sp.	Prt.	θ	Sp.	θ	Sp.	θ	θ	θ	Prt.	θ	Sp.	θ	θ	θ	θ	fk.	Prt.	θ	Sp.	θ	θ	θ	θ
Kamaran 15	θ	Prt.	θ	Sp.	θ	θ	θ	θ	θ	Sp.	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	Sp.	θ	θ	θ	θ	θ	θ
Konstantin. I	k.	k.	fk.	k.	Prt.	fk.	Sp.	Prt.	k.	k.	fk.	k.	Prt.	Prt.	θ	Sp.	Prt.	fk.	θ	Sp.	θ	Sp.	θ	θ
Gasslhuber	k.	k.	fk.	k.	Sp.	Sp.	θ	θ	k.	k.	fk.	Prt.	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ

Und auch ein weiterer Versuch (Tab. X) zeigt wiederum, daß nach Absättigung mit dem Kamaranstamm 10 und 14 die Agglutinine für Kamaranstämme vollständig adsorbiert werden und daß trotzdem noch eine gewisse Menge an Agglutinin für andere Stämme freibleibt. Allerdings wird auch ein großer Teil der Agglutinine für die anderen Cholerastämme adsorbiert, da das abgesättigte Serum höchstens bis 400-fach agglutiniert.

Jedenfalls sprechen diese Versuche für die Annahme, daß die hier entwickelten Verhältnisse durch besondere Agglutinogene der Kamaranstämme erklärt werden können.

Tabelle XI.

Agglutinationsuntersuchungen mit abgesättigtem Norbert-Serum (1 ccm + 2.5.10 Oese Kultur 6 St. bei 37° zentrifugiert und abpipettiert).

Cholerastämme		Mit Konstantinopel II abgesättigtes Serum						Mit Gasslhuber abgesättigtes Serum					
		200	400	600	1200	1600	2000	200	400	800	1200	1600	2000
Konstantinopel II	1 St.	0	0	0	0	0	0	.	.	.	.	.	.
	15 "	0	0	0	0	0	0	.	.	.	.	.	.
Gasslhuber	1 "	.	.	.	.	.	.	0	0	0	0	0	0
	15 "	.	.	.	.	.	.	0	0	0	0	0	.
El Tor 2	1 "	fk.	0	0	Sp.	0	0	Prt.	Prt.	Sp.	0	0	0
	15 "	fk.	0	0	0	0	0	fk.	Sp.	0	0	0	0
El Tor 4	1 "	Prt.	Sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	15 "	fk.	Sp.	0	0	0	0	Sp.	0	0	0	0	0
Kamaran 2	1 "	0	0	0	0	0	0	Sp.	0	0	0	0	0
	15 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kamaran 6	1 "	Prt.	Sp.	Sp.	0	0	0	Sp.	Sp.	0	0	0	0
	15 "	fk.	0	0	0	0	0	fk.	Prt.	0	0	0	0
Kamaran 10	1 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	15 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kamaran 15	1 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	15 "	0	0	0	0	0	0	Prt.	0	0	0	0	0
Charkow	1 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	15 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Wurden diese Versuche (Tab. XI) mit Cholerastamm Gasslhuber und Konstantinopel II oder El Tor (s. Tab. X) ausgeführt, so konnten zwar auch gewisse Unterschiede konstatiert werden, insofern das Serum die zur Absättigung verwendeten Stämme nicht mehr agglutiniert, wohl aber einzelne El Tor-Stämme und Kamaranstämme. Die hier festgestellten Unterschiede sind jedoch nicht so beweisend, wie die vorangehenden. Irgendwelche Beweiskraft gegen die Annahme der selbständigen Agglutinogene kann diesen letzteren Befunden deswegen nicht zukommen, da es ja möglich wäre, daß die Agglutinogene der Bakterien sowie die Agglutinine im Serum durch Fällung des Hauptagglutinogens mitgefällt werden können (s. Sacharoff, Hamburger und Dehne, Kraus und Pribram).

Zum Schlusse dieser Auseinandersetzungen bliebe noch die Frage offen, warum mit hochwertigen Seris die mit niederwertigem Agglutinin festgestellten Unterschiede nicht nachgewiesen werden können. Eine bestimmte Antwort auf diese Frage können wir bis jetzt nicht geben.

### Zusammenfassung.

Als sicherstehend können wir die Tatsache hinstellen, daß die in der Epidemie 1908 in Kamaran (Arabien) von Delpino gezüchteten Cholerastämme sowohl gegenüber den spezifischen El Tor-Stämmen (Arabien) als auch anderen Cholerastämmen gegenüber ein verschiedenes agglutinatorisches Verhalten aufweisen.

Diese Unterschiede ließen sich mit hochwertigen Agglutininen (Pferd) nicht ermitteln und sind nur bei Anwendung niederwertiger Agglutinine feststellbar gewesen.

Durch die Absättigungsversuche ist es auch wahrscheinlich gemacht, daß die Ursache für diese Unterschiede im agglutinatorischen Verhalten in besonderen Agglutinogenen zu suchen sei.

*Nachdruck verboten.*

## Ueber die ätiologische Bedeutung des Bordetschen Keuchhustenbacillus und den Versuch einer spezifischen Therapie der Pertussis.

[Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institut in Wien  
(Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf).]

Von Dr. St. Bächer und Privatdozent Dr. V. K. Menschikoff (Kasan).

Seit Bordet und Gengou in ihrer grundlegenden Arbeit ein wohlcharakterisiertes, influenzaähnliches Bakterium als Erreger des Keuchhustens proklamierten, wurde in einer Reihe von Veröffentlichungen der Autoren selbst und anderer Forscher (Klimenko, Seiffert, Slesswijk) diese Auffassung bestätigt und weitere Kenntnisse über das Vorkommen und die Eigenschaften des Bacillus gewonnen. Nach Bordet und Gengou werden die schweren Krankheitssymptome des Keuchhustens durch ein vom Erreger produziertes Toxin verursacht, dessen Wirkungen noch lange fortbestehen, wenn das Stäbchen am Ort seiner primären Ansiedlung, der Larynxschleimhaut, nicht mehr zu finden ist. Schon nach kurzer Zeit wird es nämlich von anderen Bakterienarten derart überwuchert, daß der Nachweis resp. die Züchtung nur in den allerersten Wochen zu gelingen pflegt. Bordet und Gengou, wie auch die anderen Autoren, konnten trotz dieses lokalisierten und rasch vorübergehenden Auftretens des Bacillus im Serum nach Ablauf der Krankheit mehr oder weniger regelmäßig Agglutinine und komplementablenkende Antikörper beobachten. Schon Bordet und Gengou haben daher den Versuch einer ätiologischen Therapie der Pertussis unternommen. Allerdings gelang ihnen die Gewinnung eines echten Toxins nicht, dagegen konnten sie auf besonderen Nährböden ein Endotoxin erlangen, das lokal auf Schleimhaut und Haut schwere hämorrhagische Nekrosen verursacht, Meerschweinchen und Kaninchen sowie — nach Klimenko — noch mehrere andere Tierarten in geringer Menge tötet und bei Affen und jungen Hunden von der Larynxschleimhaut aus Hustenanfälle auslösen läßt. Aber weder das mit Vollbakterien, noch

das mit dem Endotoxin als Antigen erzeugte Serum erwies sich gegenüber dem Endotoxin, oder gar bei der Anwendung am Menschen bisher genügend wirksam (Bordet und Gengou). Dagegen berichtet Freeman, der mit einem Vaccin aus Keuchhustenstäbchen therapeutische Versuche vornahm, ohne genauere Angaben über eine günstige Beeinflussung des Verlaufes.

Vor einiger Zeit hat auch der eine von uns (Menschikoff) zunächst die Frage einer Nachprüfung unterzogen, in welchen Stadien des Keuchhustenprozesses positive Befunde des angeblichen Erregers erhalten werden. Menschikoff konnte damals ein Stäbchen, das er mit dem Bordetschen identifizierte, nicht nur in vielen Fällen in den ersten Krankheitswochen, sondern in einigen, wenn auch immer spärlicher zwischen anderen Bakterien noch bis in die 8. Krankheitswoche im Sputum nachweisen, und glaubte ebenfalls in einigen wenigen daraufhin geprüften Fällen im Serum das Vorhandensein spezifischer Antikörper (Agglutinine und komplementablenkende) konstatieren zu können. Immerhin schien uns zur endgültigen Entscheidung die Nachprüfung dieser Frage an einem größeren Materiale erforderlich. Gelegenheit hierzu war uns durch das dankenswerte Entgegenkommen des Herrn Prim. Pospischil auf dessen Ableitung geboten, wo stets eine größere Anzahl keuchhustenkranker Kinder durch längere Zeit als Spitalpatienten geführt werden. Dadurch war uns aber auch die Möglichkeit gegeben, einer Aufforderung von Prof. R. Kraus entsprechend systematische Versuche einer Vaccintherapie der Pertussis in Angriff zu nehmen.

#### I.

Nachdem wir dank der Liebenswürdigkeit des Herrn Prof. Bordet Originalstämme seines Keuchhustenbacillus in Händen hatten, war es uns möglich, die Identifizierung anderer aus unseren Fällen reingezüchteter Stämme auf Grund der bakteriologischen und serologischen Kriterien durchzuführen. Allerdings müssen wir von vorneherein feststellen, daß der uns von Bordet zuerst zugesendete Stamm (Bordet I) im Gegensatz zu den neueren Angaben der Literatur auf Ascitesagar höchstens in einer Generation, auf gewöhnlichem Agar aber überhaupt nicht fortkam, während ein zweiter, uns später von Bordet freundlichst übermittelter Stamm (Bordet II) sich überhaupt nur auf den spezifischen Blutnährboden züchten ließ. Auch bildeten beide Stämme nach 24-stündigem Wachstum einen grauweißen dichten Rasen, der sich leicht abheben und gut verteilen ließ. Gleichzeitig war eine Braun- bis Schwarzfärbung des Nährbodens erfolgt. Während die nach Bordets Vorschrift mit Blut vom Kaninchen oder Pferd bereiteten Medien sich als vorteilhaftes Kulturmateriale erwiesen, waren die mit Menschenblut hergestellten Nährböden unbrauchbar, es erfolgte kein oder äußerst kümmerliches Wachstum. Im mikroskopischen Präparat waren am besten nach Färbung mit erwärmtem, verdünntem Karbolfuchsin oder Kühneschem Methylenblau kleine, wenig polymorphe, bipolar gefärbte Stäbchen zu sehen.

Zur Reinzüchtung weiterer Stämme aus unseren Pertussisfällen benutzten wir das mit sterilen Tupfern aus dem Schlund entnommene Sekret, nachdem wir durch leichte Reizung, Druck auf den Kehlkopf einen Hustenanfall provoziert hatten. Obwohl wir aus technischen Gründen nur größere Kinder, und diese wohl niemals vor der 3. Krankheitswoche untersuchen konnten, fanden auch wir bei einem großen



Teil derselben auf dem spezifischen Nährboden zwischen mehr oder weniger überwuchernden anderen Arten Stäbchenkolonien, die sich nach dem Aussehen und mikroskopisch in nichts von unseren Originalkulturen unterschieden. In drei Fällen haben wir solche Kolonien rein gezüchtet und die gewonnenen Stämme einer weiteren Untersuchung unterzogen. Auch hierbei ergaben sich keine wesentlichen Differenzen gegenüber den Originalstämmen. Zwar wuchsen erstere noch nach wiederholter Ueberimpfung ausschließlich auf den Blutnährböden und auch auf diesen deutlich zarter als die Stämme Bordets. Doch wurde ihre Identität wohl zweifellos durch das Ergebnis des Komplementablenkungsverfahrens festgestellt. Um spezifische Sera zu erhalten, behandelten wir die Kaninchen 25, 100 und 449 wöchentlich mit subkutanen Injektionen steigender Mengen von lebenden Bacillen des Stammes Bordet II. Nach einem Monat hatten die Sera der Tiere komplementablenkende Fähigkeit nicht nur mit einem Antigen aus Stamm Bordet II, sondern auch mit einem aus Stamm Bordet I, und in gleicher Weise auch mit den aus unseren Stämmen Angerer, Layer, Schwab hergestellten Antigenen gewonnen.

### Tabelle I.

**4. März 1911.**

### Komplementablenkung.

**Kaninchenimmunsera** — verschiedene Antigene.

Antigenverdünnung + Serum resp. phys. Lösung ad 1,5 ccm + 0,4  $\frac{1}{10}$ -Kompl. (2-fach lösende Dosis) 4 Stunden bei Zimmertemperatur, dann + Blutambozeptorgemisch (je 1,0 5 Proz. Hammelblutaufschw. + 0,5  $\frac{1}{150}$  Ambozeptor, 2-fach lösende Dosis) 1 Stunde bei 37°, dann 12 Stunden Zimmertemperatur.

**Kaninchenimmunsera:** 25 und 100 vom 27. Febr. inaktiviert.

**Antigene:** Aufschwemmungen der Bacillen in phys. Lösung.

	Bordet I				Bordet II				Angerer			
Antigen	0,05		0,02		0,05		0,02		0,05		0,02	
Serum	25	100	25	100	25	100	25	100	25	100	25	100
0,1	p	Sp	fk	Sp	Sp	ø	fk	Sp	p	Sp	fk	Sp
0,05	p	Sp	k	p	p	Sp	k	p	p	Sp	k	p
0,02	.	p	.	p	.	p	.	fk	fk	p	k	fk
0,01	.	p	.	fk	.	p	.	k	.	p	.	k
Kontrollen ohne Serum	0,1	fk	0,05	k	0,1	k	0,05	k	0,1	k	0,05	k

Kontrollen ohne Antigen	}	Serum 25	{	0,2 k	}	Serum 100	{	0,2 k
				0,1 k				0,1 k

Sp = Spur Hämolyse, p = partielle Hämolyse, fk = fast komplette Hämolyse.  
k = komplette Hämolyse.

Mit den Stämmen Layer und Schwab erhielten wir analoge Resultate, wie in dem in Tab. I mitgeteilten Versuch mit Stamm Angerer. Hervorzuheben wäre, daß in diesen wie in den anderen später zu besprechenden Ablenkungsversuchen positive Resultate nur dann zu erhalten waren, wenn abweichend von dem sonst üblichen Verfahren das Komplement vor Zusatz des Blutambozeptorgemisches durch 4 Stunden bei Zimmertemperatur mit dem Antigenserumgemenge vereinigt war. Das Agglutinationsverfahren ließ uns leider bei den Identifizierungsversuchen ebenso wie später beim Kranken deshalb im Stiche, weil alle untersuchten Stämme zur spontanen Agglutination neigten.

Ueber die Pathogenität unserer Stämme vermögen wir nicht viel zu sagen. Sicher vermochte auch der Stamm Bordet II selbst in der

Menge einer ganzen Kulturabschwemmung ein Meerschweinchen bei intraperitonealer Infektion nicht zu töten. Etwas höhere Virulenz besaß Stamm Angerer (eine Kultur tötete ein Meerschweinchen in 24 Stunden). Die anderen Stämme waren anscheinend wenigstens für Meerschweinchen avirulent. Wir haben demgemäß darauf verzichtet, festzustellen, ob etwa die von uns erzeugten Immunsera auch eine antiinfektiöse Wirkung besaßen. Erwähnenswert scheint es uns immerhin, daß zwei von ihnen deutlich nachweisbaren Bakteriotropingehalt hatten.

## Tabelle II.

## 7. März 1911. Bakteriotroper Versuch.

0,2 Bakt.-Aufschw. + 0,2 Serum (verd.) + 0,2 Leukocyten, 1 Stunde bei 37°, dann Objektträgerausstriche aus dem Sediment, Färbung mit  $\frac{1}{10}$  Giemsa 10 Min.

Bakt.-Aufschw.: 48 Stunden Blutagarkultur von St. Bordet II in 2 ccm phys. Lösung aufgeschwemmt.

Sera (von Kaninchen  $\frac{1}{2}$  Stunde bei 56° inaktiviert): 10-fache und 100-fache Verdünnung. 25, 100, 449 Pertussisimmunsera, a und b normale Kaninchensera.

Leukocyten von Meerschweinchen aus Peritonealexsudat.

Serum	25	$\left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{10} \\ \frac{1}{100} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{sehr stark} \\ \text{stark} \end{array} \right.$
"	100	$\left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{10} \\ \frac{1}{100} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{sehr stark} \\ \text{" "} \end{array} \right.$
"	449	$\left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{10} \\ \frac{1}{100} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{mäßig} \\ \text{"} \end{array} \right.$
"	a	$\left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{10} \\ \frac{1}{100} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{"} \\ \text{"} \end{array} \right.$
"	b	$\left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{10} \\ \frac{1}{100} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{"} \\ \text{gering} \end{array} \right.$
ø			(phys. Lösung) gering

Zur Identifizierung schien uns aber auch dieses Verfahren, bei dem wir nach der Methode Neufelds vorgehen, nicht geeignet. Wir haben uns ferner im Hinblick auf die präzisen, von anderen Autoren bestätigten Angaben von Bordet und Gengou über die Möglichkeit, ein hochwirksames Endotoxin des Keuchhustenbacillus darstellen zu können, bemüht, auch unsererseits ein solches zu gewinnen. Aber obwohl wir bis auf einen einzigen, wohl belanglosen Punkt — wir züchteten in Kollischen Flaschen, statt in Epruvetten — genau den Angaben Bordets zu folgen suchten, konnten wir mit den aus den immerhin etwas infektiösen Stämmen Bordet II und Angerer erhaltenen Produkten die geschilderten toxischen Effekte am Meerschweinchen nicht beobachten. Die Tiere vertrugen ohne Erscheinungen über 100 mg der Trockensubstanz, intraperitoneal in Lösung injiziert, während Bordet schon  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$  dieser Menge letal fand.

## II.

Unsere bisherigen Untersuchungen bestätigen neuerdings die Angaben von Bordet und Gengou, wie auch der anderen Autoren, insoweit sie das häufige Vorkommen eines wohlcharakterisierten Stäbchens im Sputum bei Pertussis betreffen. Sicherlich aber beweist das Vorkommen in den krankhaften Sekreten allein noch nichts für die ätiologische Bedeutung eines Keimes. Auch jene Autoren haben daher von Anfang an nach dem Auftreten spezifischer Antikörper im Serum der Keuchhustenkranken und Rekonvaleszenten gefahndet und haben zur Unterstützung ihrer ätiologischen Hypothese über positive Befunde berichtet.



Insbesondere im Hinblick auf die eventuellen Aussichten einer Vaccintherapie schien uns auch die Nachprüfung dieser Angaben wichtig. Freilich mußte die fast allgemein verbreitete und auch von Bordet und Gengou vertretene pathogenetische Auffassung der Pertussis als Toxinwirkung von einem streng lokalisierten, rasch vorübergehenden Herde auf der Schleimhautoberfläche aus die Aussichten einer solchen Therapie nicht eben groß erscheinen lassen. Jedenfalls aber dürfte man wohl nur dann von ihr einiges erwarten, wenn es auch beim spontanen Ablauf der Krankheit, besonders im Stadium der Rekonvaleszenz, zur Bildung solcher Schutzstoffe kommt, durch deren Vermehrung oder raschere Bildung die Vaccination erfolgreich wirken könnte. Wir haben demgemäß die Sera von Kindern mit Keuchhusten in jedem Stadium, wie auch einer Anzahl anderer Kinder mit anderen Krankheiten auf ihre komplementablenkende Fähigkeit geprüft. Auf die Untersuchung anderer Immunitätsreaktionen mußten wir verzichten, betreffs der Agglutination, wie bereits erwähnt, wegen der Spontanagglutinabilität aller Stämme. Auch die Durchführung der Komplementbindungsreaktion ergab zunächst beträchtliche Schwierigkeiten, einerseits wegen der meist nur minimalen Blutmenge, die uns von den kleinen Kindern zur Verfügung stand, anderseits da, wie bereits erwähnt, bei Pertussis die übliche Bindungstechnik (1 Stunde bei 37°) auch bei Immunseris keine Resultate gibt. Ersteres Hindernis beseitigten wir meist in der Art, daß wir den ganzen Versuch mit halben Dosen (Blut etc.) durchführten, letzteres nach Bordets Angabe durch 4 Stunden Bindung bei Zimmertemperatur. Von 27 Fällen von Pertussis, worunter sich leichte und schwere, solche auf der Höhe der Krankheit, wie auch Rekonvaleszenten, zum Teil viele Wochen nach Aufhören der Anfälle befanden, und einige wiederholt untersucht wurden, ergab nicht ein einziger in der Dosis von 0,1, die in der Regel allein geprüft wurde, Ablenkung des Komplementes, ebensowenig natürlich die Sera der Kontrollfälle. Gleichzeitig hatten wir allerdings die Vaccination mehrerer der hier untersuchten, wie auch anderer Pertussisfälle in Angriff genommen. Zur Behandlung diente ausschließlich ein aus dem Stamm Bordet I von uns hergestelltes Vaccin. Die Bereitung desselben erfolgt folgendermaßen: Mehrere 24-Stunden-Kulturen auf Blutglyzerinagar wurden mit der Platinöse aufgenommen und durch Verreiben in steriler physiologischer Kochsalzlösung gleichmäßig verteilt. Durch Schütteln mit Porzellankugeln wurde die Verteilung noch vervollkommenet, bis das mikroskopische Präparat keine größeren Klumpen zeigte. Die Abtötung der Kultur erfolgte durch Erhitzung auf 60° durch mehrere Stunden, da sich einstündige Erhitzung als unzureichend erwies. Zur Aufschwemmung wurde dann noch ein Zusatz von 1/2 Proz. Karbol hinzugefügt und ihr Gehalt an Keimen nach dem von Wright ausgearbeiteten Verfahren der indirekten Zählung in Mischungen mit Blutkörperchen festgestellt. Der Titer unserer Stammaufschwemmung war 2,4 Milliarden pro Kubikzentimeter. Sie, wie die erforderlichen Verdünnungen wurde im Eisschrank aufbewahrt.

Die zur Behandlung herangezogenen Fälle standen zumeist in der 3. — 4. Krankheitswoche, einige wohl auch in der 5. oder 6. Leider war es uns aus äußeren Gründen nicht möglich, noch frischere Fälle in Angriff zu nehmen, da solche fast niemals in die Abteilung gelangen. Es waren im ganzen 24 ausschließlich unkomplizierte, aber mindestens mittelschwere Fälle mit deutlichen Attacken, die der Behandlung zu-

geführt wurden. Das Alter der Kinder schwankte zwischen 11 Monaten und 9 Jahren. Die Anfangsdosis betrug 5, 10 oder 20 Millionen und wurde in der Regel wöchentlich nach dem Schema 5, 10, 20, 50, 100 200 Millionen gesteigert. In einigen Fällen wurde aber mehrmals hintereinander in kürzeren Intervallen (jeden 2.—3. Tag) dieselbe Dosis injiziert, und immer erst nach der 3. Injektion gestiegen. Die Höchstmenge betrug in solchen Fällen nur 80 Millionen, in einigen Fällen sogar nur 40 Millionen. Dementsprechend schwankte auch die injizierte Gesamtmenge zwischen 105 und 435 Millionen, die Dauer der Behand-

Tabelle III.

Name	Alter	Beginn in der ... Woche	Anfangsdosis Mill.	Zahl der Injek- tionen	Dauer der Be- handlung in Wochen	Enddosis (Ge- samtmenge) Mill.	Einfluß auf die Anfälle	Krankheits- dauer
Trinkl, Anna	1 $\frac{3}{4}$ Jahre	3.	5	7	6	435	fraglich	10 Wochen
Scharf, Hermine	11 Mon.	3.	5	7	6	435	Besserung wäh- rend d. Behandl.	10 "
Zobel	8 Jahre	4.	20	4	4	220	fraglich	14 "
Stogermüller	7 "	2.	10	5	4	230	"	6 "
Bilik	2 "	1.	10	5	4	230	kein Einfluß	7 "
Zeller	19 Mon.	?	20	4	4	220	Besserung nach 3 Injektionen	8 "
Waesche	2 Jahre	5.	5	8	4	105	während der Be- handl. Anfälle seltener	16 "
Onodi	3 "	3.	5	7	6	435	sehr rasche Ver- minderung der Anfälle	9 "
Urenicek	2 "	4.	5	7	6	435	kein Einfluß	10 "
Heilek, Albertine	4 $\frac{1}{2}$ Jahre	3.	20	4	4	220	fraglich	7 "
Kouba	6 "	5.	10	5	3	230	kein Einfluß	14 "
Zottel	8 "	5.	5	8	4	105	" "	15 "
Matouschek	15 Mon.	3.	10	5	6	230	" "	19 "
Fabian, Franz	5 Jahre	4.	10	6	4	370	" "	24 Wch., nicht entlassen
Swoboda, Ferdinand	3 "	7.	5	10	4	215	kein Einfluß bis Ended. Behandl.	21 Wch., nicht entlassen
Robinek, Leopoldine	8 "	6.	5	10	4	215	Besserung wäh- rend d. Behandl.	20 Wch., nicht entlassen
Robinek, Franz	6 "	5.	5	10	4	215	während der Be- handlung ging die Zahl der An- fälle zurück	19 Wch., nicht entlassen
Danecek, Franz	3 "	4.	5	10	4	215	kein Einfluß	19 Wch., nicht entlassen
Bacik, Amalie	3 "	4.	20	7	4	260	" "	16 Wch., nicht entlassen
Simet, Marie	7 "	4.	20	7	4	260	Zunahme der An- fälle	17 Wch., nicht entlassen
Schenauer	9 "	6.	20	8	4	420	allmählich Rück- gang d. Anfälle	19 Wch., nicht entlassen
Weiser, Karoline	5 "	4.	5	8	4	105	kein Einfluß	(Scharlach) 18 Wch., nicht entlassen
Swoboda, Hermine	5 "	1.	10	5	4	230	" "	19 Wch., nicht entlassen
Racik, Margarete	4 "	3.	5	8	4	105	" "	17 Wch., nicht entlassen

lung zwischen 3 und 6 Wochen, die Zahl der Injektionen zwischen 4 und 10. Ueberblicken wir das Resultat dieser 24 vaccinierten Fälle, deren Zusammenstellung Tab. III gibt, so kann weder von einem eklatanten Einfluß auf die Anfälle noch auf die Krankheitsdauer im allgemeinen die Rede sein.

Die Durchführung der Behandlung nach unseren Vorschlägen, insbesondere aber die klinische Beobachtung und Beurteilung, hatte Dr. Gielzynzky, Sekundärarzt der Abteilung, übernommen, wofür wir ihm zu bestem Dank verpflichtet sind. Herr Prim. Pospischil, der die Güte hatte, unsere Bestrebungen nicht nur durch Ueberlassung der Fälle zu fördern, sondern auch deren Effekt fortlaufend zu überwachen, konnte auf Grund seiner reichen Erfahrung unser Urteil über den wesentlich negativen Erfolg der therapeutischen Versuche nur bestätigen. Wenn in einigen Fällen im Verlauf der mehrwöchentlichen Behandlung eine weitgehende, rasche Besserung auftrat, so konnte diese keineswegs mit Sicherheit auf die Vaccination zurückgeführt werden, da ein solcher Verlauf spontan keineswegs selten ist. Die Mehrzahl der Fälle mußte ebenso wie die sonstigen Keuchhustenkinder der Abteilung über die 10. Woche nach Krankheitsbeginn im Spital behalten werden.

Tabelle IV.

Name	vor d. Behandlung	nach der .... Injektion										nach Abschluß der Behandlung
		I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	X.	
Trinkl, Anna	neg.	—	—	—	neg.	neg.	pos. 0,05	—	.	.	.	neg.
Scharf, Hermine	"	—	neg.	—	"	—	—	—	.	.	.	
Zobel	"	—	"	—	—	.	.	.	.	.	.	
Stogermüller	"	—	"	—	—	—	.	.	.	.	.	
Bilik	"	—	—	—	—	—	.	.	.	.	.	
Zeller	"	—	—	—	—	.	.	.	.	.	.	
Waesche	—	—	—	—	—	neg.	—	—	.	.	.	neg.
Onodi	neg.	—	—	neg.	neg.	"	pos. 0,1	—	.	.	.	
Urenicek	"	—	—	pos. 0,02	"	"	st. pos. 0,05	—	.	.	.	
Heilek, Albert.	"	—	neg.	—	—	—	.	.	.	.	.	pos. 0,1—0,05
Kouba	"	—	pos. 0,05	—	—	pos. 0,1	pos. 0,1	.	.	.	.	
Zottel	—	—	—	—	—	neg.	—	—	.	.	.	
Matouschek	neg.	—	—	—	—	—	.	.	.	.	.	
Fabian	"	—	neg.	—	—	pos. 0,1	st. pos. 0,1	.	.	.	.	
Swoboda, Ferd.	—	—	—	—	—	—	—	pos. 0,1	—	—	—	neg.
Swoboda, Herm.	neg.	—	—	neg.	—	—	.	.	.	.	.	
Robinek, Leopol.	—	—	—	—	—	—	—	neg.	—	—	—	
Robinek, Franz	—	—	—	—	—	—	—	"	—	—	—	
Danecek, Franz	—	—	—	—	—	—	—	"	—	—	—	pos. 0,05
Bacik, Amal.	—	—	—	—	—	neg.	—	—	.	.	.	
Simet, Marie	—	—	—	—	—	"	—	—	.	.	.	neg.
Schenauer	—	—	—	—	—	st. pos. 0,1	—	—	.	.	.	pos. 0,1—0,05
Weiser, Kar.	—	—	—	—	—	neg.	—	—	.	.	.	neg.
Racik, Marg.	—	—	—	—	—	—	—	—	.	.	.	

Diesem negativen Urteil der klinischen Beobachtung stehen allerdings positive Ergebnisse der serologischen Untersuchung gegenüber.

Während wir bei unbehandelten Fällen niemals Komplementablenkung durch 0,1 Serum erhielten, zeigt Tab. IV, daß das Serum mehrerer Kinder im Verlauf der Behandlung die Fähigkeit gewann, in Mengen von 0,1 oder 0,05, in einem Falle sogar von 0,02, deutlich abzulenken.

Nach dem negativen Ausfall unserer Untersuchungen bei unbehandelter Pertussis scheint uns dieses Resultat aber kaum von besonderem Belang zu sein. Ein Parallelismus des Krankheitsverlaufes mit dem Auftreten jener Antikörper läßt sich aus unseren Beobachtungen auch nicht feststellen. Da sie bei spontaner Heilung zu fehlen scheinen, liegt wohl auch kein Grund vor, ihre Bildung für notwendig zu halten und therapeutisch herbeizuführen.

Unsere negativen serologischen Ergebnisse bei unbehandelter Pertussis möchten wir aber trotzdem kaum im Sinne einer Ablehnung der ätiologischen Bedeutung des Bordetschen Bacillus deuten. Sie scheinen uns vielmehr mit der oben skizzierten pathogenetischen Auffassung des Keuchhustens als Toxinwirkung von einer Lokalerkrankung aus recht gut im Einklang zu stehen. Die positiven Angaben der anderen Autoren über das Vorkommen von spezifischen Antikörpern lassen sich eigentlich mit dieser Theorie viel schwerer in Uebereinstimmung bringen.

#### Schlusssätze.

- 1) Bei vielen Pertussisfällen findet sich im Auswurf das von Bordet und Gengou als Erreger bezeichnete Stäbchen, und zwar auch in den späteren Krankheitswochen.
- 2) Die isolierten Stämme stimmen in allen wesentlichen Merkmalen mit den Originalstämmen überein. Allerdings konnten die Angaben über diese betreffs Pathogenität, Toxinbildung, Wachstum auf gewöhnlichem Nährboden nicht in allen Punkten bestätigt werden.
- 3) Die Identifizierung der Stämme wird durch das Komplementablenkungsverfahren mit Seris immunisierter Kaninchen ermöglicht.
- 4) Solche Sera enthalten auch reichlich Bakteriotropine.
- 5) Die Sera von nicht spezifisch behandelten Pertussiskranken und Rekonvaleszenten enthalten in der Regel ebensowenig wie die von Gesunden und anderen Kranken komplementablenkende Antikörper für das Antigen aus Bordetschem Bacillus.
- 6) Im Serum wiederholt mit Vaccin behandelter Kranker treten solche Antikörper auf, doch ohne Zusammenhang mit dem Verlauf der Krankheit.
- 7) Ein Erfolg der Vaccinationstherapie war trotz verschiedenartiger Modifizierung der Behandlung klinisch nicht zu beobachten.
- 8) Das Fehlen von komplementablenkenden Antikörpern im Serum bei spontanem Verlauf schließt die ätiologische Bedeutung des Bordetschen Bacillus nicht aus, wenn die Pertussis als fortdauernde Toxinwirkung einer rasch vorübergehenden, oberflächlichen Schleimhautaffektion anzusehen ist.

**Literatur.**

- Bordet et Gengou, Le microbe de la coqueluche. (Ann. Instit. Past. T. 20. p. 731.)  
 Klimenko, Aetiologie des Keuchhustens. Der experimentelle Keuchhusten. (Russky Wratsch. 1908. No. 19.)  
 Bordet et Gengou, Etiologie de la coqueluche. État actuel de la question. (Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Ref. Bd. 43. p. 273.)  
 — —, L'endotoxine coquelucheuse. (Ann. Instit. Past. T. 23. p. 415.)  
 Freeman, Diskussion zu Prof. Bordets: The microbe of whooping cough. (Brit. med. Journ. Vol. 2. 1909. p. 1604.)  
 Klimenko, Morphologie und Biologie des Keuchhustenbacillus. (Arch. d. scienc. Biol. Inst. de méd. expér. à St. Pétersbourg. 1909.)  
 Menschikoff, Ueber den Erreger des Keuchhustens. (Russky Wratsch. 1909. No. 31.)  
 Seiffert, Ueber den Bordetschen Keuchhustenbacillus. (München. med. Wochenschr. 1909. No. 3.)  
 Sleeswijk, Ueber die Aetiologie des Keuchhustens. (Nederl. Tijdschr. v. Geneesk. 1909. II. 2.)  
 Bordet et Gengou, Note complémentaire sur le microbe de la coqueluche. (Ann. Instit. Past. T. 21. p. 720.)  
 — —, Le microbe de la coqueluche. (Ann. Instit. Pasteur. T. 21. p. 733.)  
 Klimenko, Bakteriologische Untersuchungen des Blutes von keuchhustenkranke Kindern und von mit Keuchhusten infizierten Tieren. (Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Orig. Bd. 56. p. 497.)

*Nachdruck verboten.*

## Experimentelle Beiträge zum Mechanismus der Antitoxinwirkung.

[Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institut in Wien  
 (Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf).]

Von Dr. **Erwin von Graff**, Assistent der Klinik Prof. Wertheim,  
 und Priv.-Doz. Dr. **V. Menschikoff** (Kasan).

Durch die Arbeit über den Mechanismus der Antitoxinwirkung bei der Heilung haben Kraus und Amiradzibi<sup>1)</sup> unseren Vorstellungen darüber, wie die Neutralisation des einmal in die Zellen eingedrungenen Toxins erfolgt, zum erstenmal eine experimentelle Grundlage gegeben. Es mußte zwar nach den Untersuchungen von Dönitz angenommen werden, daß z. B. das Tetanusantitoxin nicht nur imstande ist, das frei zirkulierende Tetanusgift zu neutralisieren, sondern auch schon gebundenes Gift — vorausgesetzt, daß die Verbindung nicht schon zu fest geworden war — zu lockern, und aus seinen Verbindungen auszutreiben, also vermutlich auch auf das schon in Körperzellen eingedrungenes, oder an sie gebundenes Toxin Einfluß zu nehmen, doch war nicht entschieden, ob dabei das Antitoxin in die Zelle selbst eindringt, oder ob das an die Zelle gebundene Toxin infolge einer höheren Affinität vom Antitoxin aus der Zelle herausgezogen und außerhalb derselben neutralisiert wird.

Kraus und Amiradzibi verwendeten zu ihren Versuchen rote Blutkörperchen und konnten zunächst zeigen, daß Pferde- und Rinder-serum auch nach längerer Zeit nicht in dieselben eindringt, indem es sich noch nach 6 Stunden im Waschwasser quantitativ nachweisen läßt.

1) Kraus, R. und Amiradzibi, Ueber den Mechanismus der Antitoxinwirkung bei der Heilung. (Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Bd. 6. 1910. Heft 1.)

In gleicher Weise konnten sie zeigen, daß auch kein Antihämotoxin in die roten Blutkörperchen eindringt.

Nachdem es aber gelang, mit El Tor-Lysin und Tetanolysin vergiftete Blutkörperchen durch Einbringen derselben in eine Antihämotoxinlösung vor der Auflösung zu schützen, war damit der Beweis erbracht, daß das Toxin durch das Antitoxin aus den Zellen herausgezogen wurde.

Um der daraus sich ergebenden Annahme eine Stütze zu geben, daß der Vorgang der Entgiftung wahrscheinlich auch bei anderen Organzellen in ähnlicher Weise vor sich gehen dürfte, wurden die Versuche mit Kollodiumsäckchen und Schilfröhrchen wiederholt, die Toxinlösung enthielten und in eine Antihämotoxinlösung suspendiert waren. — Auch hier zeigte sich wieder, daß das Toxin unter dem Einfluß der umgebenden Antitoxinlösung aus dem Kollodiumsäckchen und Schilfröhrchen herausgezogen und außerhalb neutralisiert wird.

Wir haben nun auf Anregung von Kraus, mit Rücksicht auf den Ausfall einiger Tierexperimente — die einen Einfluß der intravenösen Seruminjektion selbst auf das schon in die Nervenbahn eingedrungene Tetanustoxin wahrscheinlich zu machen schienen — die Versuche wieder aufgenommen und mit Leberzellen und Tetanustoxin wiederholt.

# I.

Die zu den Versuchen verwendeten Leberzellemulsionen wurden aus Lebern von Menschen hergestellt, die plötzlich, ohne vorherige Krankheit infolge von Verletzungen zugrunde gegangen waren (Unglücksfälle, Selbstmörder).

Die aus der Leber möglichst steril entnommenen Stücke wurden analog dem von Freund für die Herstellung seiner Carcinomzellemulsionen angegebenen Verfahren zerkleinert, mit 1-proz. Natriumbiphosphoricum-Lösung in 0,6-proz. Kochsalzlösung im Verhältnis 1:5 in einem Mörser leicht zerrieben und durch ein ausgekochtes Koliertuch gepreßt. Die auf diese Weise gewonnenen Leberzellsedimente bestehen fast durchweg aus guterhaltenen Zellen und sind im Eisschrank längere Zeit (2—3 Wochen) haltbar, wenngleich wir es vorzogen, mit möglichst frischen Emulsionen zu arbeiten.

Zunächst galt es, die Frage zu beantworten, ob Pferdeserum bei längerem Kontakt mit den Leberzellen in dieselben eindringt oder nicht.

Zu diesem Zwecke wurde in 5 Röhrchen je 1 ccm Leberzellsediment gebracht und fallende Mengen Pferdeserum (Tetanuseilserum) hinzugefügt. Nach Auffüllen der Röhrchen auf 2 ccm mit Kochsalzlösung wurden dieselben für 2 Stunden in den Brutschrank gestellt, danach die Zellen abzentrifugiert, mit frischer Kochsalzlösung gewaschen, nochmals zentrifugiert und das überstehende Waschwasser sorgfältig abgehoben. Nun wurden sowohl das gesammelte Waschwasser als auch die Leberzellen mittels der Präzipitinreaktion auf das Vorhandensein von Pferdeserum geprüft, die in der Weise ausgeführt wurde, daß in je 1 ccm Waschwasser 0,1 auf Papier getrocknetes Pferdepräzipitinserum von Kaninchen hinzugefügt wurde. Mit den Leberzellen wurde in der Weise verfahren, daß das Zellsediment jedes einzelnen Röhrchens in einem gläsernen Reibschälchen gründlich zerrieben und mit 2 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt wurde. Zum Präzipitinnachweis wurde die durch Zentrifugieren gewonnene vollständig klare überstehende Flüssigkeit verwendet.



## Versuch 1.

Leberzellsediment 1 : 4 Kochsalzlösung je 1 ccm + Pferdeserum 2 Stunden bei 37 ° zentrifugiert, gewaschen. Waschwasser und Zellsedimentaufschwemmung je 1 ccm + 0,1 Pferdepräzipitin.

1. Leberzellsediment 1 : 4	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm
2. Kochsalzlösung	0,1 "	0,05 "	0,02 "	0,01 "	Kochsalzlösung
3. Pferdeserum	16,0 "	16,0 "	16,0 "	16,0 "	—
4. Menge des Waschwassers	trüb	trüb	trüb	trüb	—
5. 1 ccm Waschwasser + 0,1 Präzipitin	klar	klar	klar	klar	klar

## Versuch 2.

Anordnung wie bei Versuch 1.

1. Leberzellsediment 1 : 4	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm
2. Kochsalzlösung	0,1 "	0,05 "	0,02 "	0,1 "	Kochsalzlösung
3. Pferdeserum	17,0 "	17,0 "	17,0 "	17,0 "	—
4. Menge des Waschwassers	trüb	trüb	trüb	trüb	—
5. 1 ccm Waschwasser + 0,1 Präzipitin	klar	klar	klar	klar	klar

## Versuch 3.

Anordnung wie bei Versuch 1.

1. Leberzellsediment 1 : 4	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm
2. Kochsalzlösung	0,1 "	0,05 "	0,02 "	0,01 "	Kochsalzlösung
3. Pferdeserum	20,0 "	14,0 "	14,0 "	10,0 "	—
4. Menge des Waschwassers	trüb	trüb	trüb	trüb	—
5. 1 ccm Waschwasser + 0,1 Präzipitin	klar	klar	klar	klar	klar

Es zeigte sich nun in drei verschiedenen ganz analog ausgeführten Versuchen übereinstimmend, daß das Waschwasser deutlich positive Reaktion ergab, während das Mazerat der Zellen vollständig klar blieb. Auf Grund dieser Versuche können wir annehmen, daß innerhalb von 2 Stunden kein Serum in die Zellen eindringt, da bei der Empfindlichkeit der Reaktion — Kraus und Amiradzibi konnten Pferdeserum noch in Verdünnungen von 1:10 000 nachweisen — selbst minimale Spuren von Serum eine Trübung hätten geben müssen.

## II.

Nachdem durch die vorangegangenen Versuche gezeigt worden war, daß sicher kein Serum in die Leberzellen eindringt, mußte weiter die Frage beantwortet werden, ob das Tetanustoxin in die Leberzellen übergeht bzw. von denselben so weit gebunden wird, daß es durch Waschen derselben von ihnen nicht mehr getrennt werden kann.

Die unten in Kürze wiedergegebene Auswertung des benützten Trockentoxins ergab 0,00005, bzw. 0,00004 g Toxin als die Giftmenge, der weiße Mäuse innerhalb von 48 Stunden erliegen.

## Toxinauswertung.

1	weiße Maus erhält in	1,0 ccm	0,0001 g	Toxin subkutan	† 24 Stunden
1	" " " "	0,8 "	0,00008 "	" " "	† 36 "
1	" " " "	0,6 "	0,00006 "	" " "	† 48 "
1	" " " "	0,5 "	0,00005 "	" " "	† 48 "
1	" " " "	0,4 "	0,00004 "	" " "	† 48 "
1	" " " "	0,2 "	0,00002 "	" " "	† 86 "
1	" " " "	0,5 "	0,00001 "	" " "	lebt, gesund
1	" " " "	0,1 "	0,00001 "	" " "	lebt, gesund

Der Versuch selbst gestaltete sich folgendermaßen: Es wurden in 5 Röhrchen je 2 ccm Leberzellenemulsion (des beim Stehen im Eisschrank abgesetzten Sedimentes) gefüllt, zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgehoben und das Sediment mit 2 ccm Toxinlösung mit einem Gehalt von 0,002 g Trockentoxin aufgeschüttelt. Ein Kontrollröhrchen enthielt nur 2 ccm Toxinlösung ohne Leberzellen.

Nach zweistündigem Verweilen bei 37° wurden jedem Röhrchen 18 ccm Kochsalzlösung zugefügt, die Zellen abzentrifugiert und mit dem Waschwasser, sowie dem Inhalt des ebenfalls auf 20 ccm aufgefüllten Kontrollröhrchens je 2 Mäuse mit 1,0 ccm und 0,5 ccm subkutan injiziert. Die Mäuse gingen sämtlich nach 36—60 Stunden ein, ein Beweis dafür, daß das Toxin durch den 2-stündigen Aufenthalt im Brutschrank sowohl allein, als auch im Kontakt mit den Leberzellen seine Wirksamkeit nicht eingebüßt hatte.

## Versuch 4.

	1	2	3	4	5	Kontrolle
Leberzellen <sup>1)</sup>	ca. 0,3	ca. 0,3	ca. 0,3	ca. 0,3	ca. 0,3	—
0,002 Toxin in Kochsalzlös.	2 ccm	2 ccm	2 ccm	2 ccm	2 ccm	2 ccm
Nach 2 Stunden bei 37° aufgefüllt auf 20 ccm, zentrifugiert. Je 2 Mäuse mit 1,0 ccm und 0,5 ccm Waschwasser subkutan injiziert						
Mäuse mit 1,0 ccm	† n. 36 St. ca. 0,0001 Toxin	† n. 36 St.	† n. 36 St.	† n. 36 St.	† n. 40 St.	† n. 40 St.
Mäuse mit 0,5 ccm	† n. 36 St. ca. 0,00005 Toxin	† n. 36 St.	† n. 60 St.	† n. 60 St.	† n. 60 St.	† n. 60 St.
Leberzellen gründlich gewaschen (4mal mit im Ganzen 60 ccm Kochsalzlösung, in 1 ccm NaCl zerrieben) je 1 Maus subkutan injiziert						
	† n. 48 St. a. Tetanus	† n. 48 St. a. Tetanus	† n. 60 St. a. Tetanus	† n. 60 St. a. Tetanus	† n. 60 St. a. Tetanus	

Das Leberzellsediment jedes Röhrchens wurde hierauf 4mal mit je 15 ccm Kochsalzlösung gewaschen, die so gewaschenen Zellen mit 1 ccm Kochsalzlösung in einer Glasschale fein zerrieben und 5 Mäusen subkutan injiziert. Von diesen Mäusen gingen 2 nach 48 Stunden, 3 innerhalb von 60 Stunden an Tetanus ein. Es muß demnach mindestens eine tödliche Dosis Toxin während des 28-stündigen Aufenthaltes im Brutschrank mit den Leberzellen in so innige Verbindung treten — von ihnen aufgenommen worden sein — daß es nicht gelang, das Toxin durch Waschen und Schütteln von den Zellen zu trennen.

## III.

War durch die vorangegangenen Versuche der Beweis erbracht, daß einerseits kein Serum in die Leberzellen eindringt, oder in nach-

1) Entspricht in jedem Röhrchen 2 ccm Leberzellsediment.

weisbarer Menge von denselben gebunden wird, andererseits das Tetanustoxin in enge Verbindung mit den Zellen tritt, so sollte durch die folgenden Entgiftungsversuche festgestellt werden, ob durch das Einbringen von giftbeladenen Leberzellen in Antitoxinlösungen eine Entgiftung derselben eintritt.

#### Versuch 5.

4 ccm Leberzellsediment gewaschen und zentrifugiert in 20 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt, der 0,05 g festes Toxin zugesetzt waren, so daß 1 ccm der Lösung 0,0025 Toxin enthielt.

Nach 1 Stunde bei 37° wurden die Leberzellen abzentrifugiert, die Giftlösung abpipettiert und die Zellen mehrmals mit Kochsalzlösung gewaschen.

Um zu prüfen, ob die Leberzellen genügend Toxin aufgenommen haben, werden dieselben in 10 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt und davon 2 Mäuse injiziert:

- |                 |         |              |
|-----------------|---------|--------------|
| 1 Maus subkutan | 1,0 ccm | † 30 Stunden |
| 1 „ „           | 0,5 „   | † 30 „       |

Die übrigen Leberzellen werden abzentrifugiert und nach Entfernung der überstehenden Flüssigkeit mit 10 ccm einer Lösung von 0,5 Tetanusheilserum + 9,5 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

Nach 1-stündigem Verweilen bei 37° Leberzellen zentrifugiert mehrmals gewaschen, das Sediment mit 8 ccm Kochsalzlösung aufgenommen, in kleiner Portion fein zerrieben und Mäusen subkutan injiziert.

- |                |         |   |
|----------------|---------|---|
| 1. Maus erhält | 1,0 ccm | † am 8. Tage ohne ausgesprochene Symptome (Tetanusverdacht) |
| 2. „ „         | 1,0 „   | bleibt gesund   |
| 3. „ „         | 1,0 „   | „ „   |
| 4. „ „         | 1,0 „   | „ „   |
| 5. „ „         | 0,5 „   | † am 8. Tage ohne Tetanussymptome                           |
| 6. „ „         | 0,5 „   | bleibt gesund   |

#### Toxinkontrolle:

Toxinlösung, die während des ganzen Versuches teils im Brutschrank, teils bei Zimmertemperatur dem Licht ausgesetzt blieb.

- |         |         |              |
|---------|---------|--------------|
| 1. Maus | 0,5 ccm | † 48 Stunden |
| 2. „    | 1,0 „   | † 30 „       |

#### Versuch 6.

Leberzellensediment 4 ccm zentrifugiert, gewaschen. Zellen aufgeschwemmt in 20 ccm Kochsalzlösung mit 0,05 festem Toxin (1 ccm = 0,0025 Toxin).

Nach 1 Stunde bei 37° zentrifugiert, Zellen mehrmals gewaschen. Sediment aufgeschwemmt in 10 ccm Kochsalzlösung. Davon 2 Mäuse subkutan injiziert.

- |                  |         |               |
|------------------|---------|---------------|
| 1. Maus subkutan | 1,0 ccm | nach 68 St. † |
| 2. „ „           | 0,5 „   | „ 68 „ †      |

Die restlichen Zellen für 1 Stunde bei 37° in einer Lösung von 0,5 Tetanusserum auf 9,5 ccm Kochsalzlösung.

Die mehrmals gewaschenen Zellen aufgenommen in 4 ccm Kochsalzlösung fein zerrieben Mäusen subkutan injiziert.

- |                |                  |               |
|----------------|------------------|---------------|
| 1. Maus erhält | 1,0 ccm subkutan | bleibt gesund |
| 2. „ „         | 1,0 „            | „ „           |
| 3. „ „         | 0,5 „            | „ „           |
| 4. „ „         | 0,5 „            | „ „           |

**Toxinkontrolle:**

1 Maus erhält 1,0 ccm Toxinlösung subkutan † 36 Stunden.

In dem folgenden Versuch wurden die Leberzellen zum Teil nur  $\frac{1}{2}$  Stunde in Kontakt mit der Toxinlösung belassen, um zu sehen, ob auch dann von demselben Toxin in nachweisbarer Menge gebunden würde.

**Versuch 7.**

5 ccm Leberzellensediment zentrifugiert, gewaschen, die eine Hälfte aufgeschwemmt in 10 ccm einer Toxinlösung von 0,05 Toxin in 20 ccm Kochsalzlösung, in den Brutschrank gebracht, nach  $\frac{1}{2}$  Stunde der Rest des Sedimentes ebenfalls in 10 ccm Toxinlösung aufgeschwemmt.

Nach 1 bzw.  $\frac{1}{2}$  Stunde zentrifugiert, gewaschen, die Zellen in je 5 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt, davon je 2 ccm fein zerrieben Mäusen injiziert.

**Leberzellen a.**

Bindung 1 Stunde bei 37°.

1. Maus 1,0 ccm subkutan † n. 24 St.
2. „ 0,5 „ „ † „ 30 „

**Leberzellen b.**

Bindung  $\frac{1}{2}$  Stunde bei 37°.

1. Maus 1,0 ccm subkutan † n. 36 St.
2. „ 0,5 „ „ † „ 36 „

Leberzellen zentrifugiert in je 10 ccm Kochsalzlösung mit 0,3 ccm Serum aufgeschwemmt und 1 Stunde bei 37° belassen. Darauf das mehrmals gewaschene Sediment in je 5 ccm Kochsalzsediment aufgenommen, fein zerrieben, Mäusen subkutan injiziert.

**Leberzellen a.**

1. Maus 1,0 ccm bleibt gesund
2. „ 1,0 „ „ „
3. „ 0,5 „ „ „
4. „ 0,5 „ „ „

**Leberzellen b.**

1. Maus 1,0 ccm bleibt gesund
2. „ 1,0 „ „ „
3. „ 0,5 „ „ „
4. „ 0,5 „ „ „

Nachdem sich in diesem Versuch gezeigt hatte, daß auch innerhalb von  $\frac{1}{2}$  Stunde so viel Toxin von den Zellen gebunden wird, daß in 0,5 ccm der 10-proz. Aufschwemmung die tödliche Dosis enthalten ist, sollte im folgenden Versuch geprüft werden, ob die Entgiftung der Zellen auch bei kürzerer Einwirkung der Antitoxinlösung erfolgt.

**Versuch 8.**

Anordnung wie in den früheren Versuchen. Die Prüfung der toxinbeladenen Leberzellen ergab

1. Maus mit 1,0 ccm † nach 40 Stunden
2. „ „ 0,5 „ † „ 50 „

Einbringen der vergifteten gewaschenen Zellen in eine 5-proz. Antitoxinlösung auf  $\frac{1}{2}$  Stunde bei 37°, dann zentrifugiert, gewaschen und die zerriebenen in 6 ccm aufgeschwemmten Zellen 6 Mäusen injiziert:

1. Maus 1,0 ccm subkutan bleibt gesund
2. „ 1,0 „ „ „
3. „ 1,0 „ „ an Tetanus eingegangen am 6. Tag.
4. „ 0,5 „ „ bleibt gesund
5. „ 0,5 „ „ „
6. „ 0,5 „ „ „

**Toxinkontrolle:**

1. Maus 1,0 ccm † n. 40 Stunden
2. „ 0,5 „ † „ 36 „

In allen angeführten Versuchen gelang es somit, die mit Toxin beladenen Leberzellen durch  $\frac{1}{2}$ —1-stündiges Verweilen in einer 10-proz.

Antitoxinlösung zu entgiften, daß dieselben, Mäusen subkutan injiziert, keine Krankheitserscheinungen hervorriefen. Von den 2 Mäusen, die in Versuch 5 eingingen, zeigte die eine gar keine, die zweite nicht sicher als Tetanussymptome zu deutende Krankheitserscheinungen. Nur eine der 6 Mäuse, die in Versuch 8 mit Leberzellen injiziert wurde, ging an unzweifelhaftem Tetanus ein, was vielleicht doch darauf zurückzuführen ist, daß hier die Antitoxinlösung nur  $\frac{1}{2}$  Stunde, statt wie in den übrigen Versuchen 1 Stunde, mit den Leberzellen in Kontakt blieb.

Die Entgiftung der Zellen können wir uns nach den Vorversuchen nur so erklären, daß das an dieselben gebundene Toxin durch das Antitoxin aus denselben herausgezogen und außerhalb der Zellen neutralisiert wurde, was somit eine Bestätigung der von Kraus und Amiradzibi auf Grund ihrer Versuche ausgesprochenen Anschauung über den Mechanismus der Antitoxinwirkung bedeuten würde.

*Nachdruck verboten.*

## Ueber die Aktivierung des Kobragiftes durch Organextrakte.

[Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institut in Wien  
(Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf).]

Von Dr. J. v. Zubrzycki.

Calmette und seine Mitarbeiter zeigten, daß im Serum tuberkulöser Menschen Substanzen enthalten sind, welche Kobragift aktivieren. Calmette hoffte diese Tatsache diagnostisch verwerten zu können, doch zeigte sich in der Folge, daß die Fähigkeit, Kobragift zu aktivieren, dem Blutserum Tuberkulöser nicht spezifisch zukomme. Bauer und Lehdorff sowie Heynemann fanden, daß das Serum gravidar, besonders hochgravidar Frauen und Wöchnerinnen, dieselben Eigenschaften besitze, wie Serum Tuberkulöser. Kraus, v. Graff und Ranzi konnten, wie auch schon Heynemann, dieselben aktivierenden Substanzen im Serum bei verschiedenen anderen Erkrankungen vor allem aber bei Carcinom nachweisen.

Daß reine Organextrakte, z. B. aus Pankreas, Lymphdrüsen u. a. m. an und für sich die roten Blutkörperchen auflösen imstande sind, haben Metschnikoff, Korschun und Morgenroth, Schibayama, Klein, Tarassevitsch nachgewiesen.

Die aktivierende Eigenschaft der Extrakte verschiedener Organe auf die Kobrahämolyse hat jedoch bisher keine Berücksichtigung erfahren.

Ich habe nun auf Veranlassung von Prof. Kraus eine Reihe von Versuchen unternommen, um festzustellen, ob auch die Extrakte von verschiedenen Geweben und Organen Kobragift zu aktivieren imstande sind. Diese Versuche fielen positiv aus. Nunmehr ergab sich die Notwendigkeit, nachzuforschen: 1) ob ein gradueller Unterschied in der Wirksamkeit verschiedener Gewebs- und Organextrakte bestehe; 2) ob pathologische Veränderungen die Wirksamkeit der Extrakte in bestimmter Weise beeinflussen.

Die Extrakte wurden in der Weise hergestellt, daß 1 g der zu untersuchenden Gewebe im Mörser mit Zusatz von etwas Quarzsand und 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung verrieben und dann zentrifugiert wurde, bis eine mehr oder weniger gleichmäßig getrübbte Flüssigkeit zurückblieb. Nach vorsichtigem Abpipettieren wurde die Flüssigkeit bei 50° C durch 20 Minuten inaktiviert. Von den so gewonnenen Organextrakten, die immer frisch bereitete wurden, kamen steigende Mengen (0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,3 ccm) in kleine Reagenzröhrchen, zu welchen 0,2 ccm Kobralösung 1:5000 (jedesmal frisch aus der Stammlösung hergestellt) und 0,5 ccm einer 5-proz. Aufschwemmung mehrmals gewaschener Pferdeblutkörperchen zugesetzt wurden. Die Röhrchen kamen für 1 Stunde in den Brutschrank und blieben dann noch 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen. In dieser Zeit wurden in Intervallen von  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , 1 und 2 Stunden die Resultate abgelesen.

Zur Untersuchung kamen Organe von gesunden und vorbehandelten Tieren, sowie menschliche, bei Sektionen entnommene Organe.

### 1. Meerschweinchen.

Es wurden im ganzen 15 Meerschweinchen untersucht. Die Resultate waren, von geringen Abweichungen abgesehen, immer dieselben, wie sie in der nachstehenden Tabelle verzeichnet sind.

Tabelle I.

Sp = Spur; p = partielle; fk = fast komplette; k = komplette Lösung.

	Zeit der Ablesung	15 Minuten						30 Minuten						1 Stunde						2 Stunden					
		0,005	0,01	0,05	0,1	0,3	0,3	0,005	0,01	0,05	0,1	0,3	0,3	0,005	0,01	0,05	0,1	0,3	0,3	0,005	0,01	0,05	0,1	0,3	0,3
1	Leber	θ	θ	fk	k	k	θ	θ	Sp	k	k	k	θ	θ	p	k	k	k	θ	θ	k	k	k	k	θ
2	Lunge	θ	θ	k	k	k	θ	θ	θ	k	k	k	θ	θ	θ	k	k	k	θ	θ	k	k	k	k	θ
3	Nebenniere	θ	θ	p	fk	k	θ	θ	θ	p	k	k	θ	θ	θ	fk	k	k	θ	θ	θ	k	k	k	θ
4	Herz	θ	θ	θ	fk	k	θ	θ	θ	Sp	k	k	θ	θ	θ	p	k	k	θ	θ	θ	fk	k	k	θ
5	Muskel	θ	θ	θ	fk	k	θ	θ	θ	Sp	fk	k	θ	θ	θ	Sp	k	k	θ	θ	θ	p	k	k	θ
6	Gehirn	θ	θ	θ	Sp	fk	θ	θ	θ	Sp	p	fk	θ	θ	θ	p	fk	k	θ	θ	θ	fk	k	k	θ
7	Milz	θ	θ	θ	Sp	Sp	θ	θ	θ	θ	p	p	θ	θ	θ	Sp	p	fk	θ	θ	θ	p	fk	k	θ
8	Niere	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	Sp	p	θ	θ	θ	Sp	Sp	p	θ	θ	θ	Sp	p	fk	θ
9	Serum	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	Sp	θ	θ	θ	θ	Sp	fk	θ	θ	θ	Sp	p	k	θ

Wie aus der Tabelle hervorgeht, finden sich in allen den angeführten Organgeweben Kobragift aktivierende Substanzen in wechselnder Menge, wobei Leber, Lunge, Nebenniere und Herz stärker, Niere, Milz und Gehirn schwächer aktivierend wirken.

Die Organextrakte erwiesen sich durchweg um so viel wirksamer als das Blutserum desselben Tieres, daß wir die Vermutung, es könnte der Unterschied der einzelnen Organextrakte auf dem wechselnden Blutgehalt der Organe beruhen, fallen lassen mußten. Zur Sicherheit wurden indes noch nebeneinander Organextrakte von entbluteten und nicht entbluteten (durch Nackenschlag getöteten) Tieren



untersucht, wobei sich zeigte, daß die Wirksamkeit der Organextrakte durch das Entbluten der Tiere nicht beeinflusst wird.

In einer zweiten Versuchsreihe sollte festgestellt werden, ob die Organextrakte sich unter pathologischen Verhältnissen ändern.

Zu diesem Zwecke wurden Organextrakte von Meerschweinchen untersucht, die mit Cholera vibriationen infiziert, bzw. mit Diphtherietoxin, Pferde- oder Menschenserum vorbehandelt waren.

Es wurden geringe Unterschiede in der Wirkung des Nebennieren- und Milzextraktes festgestellt, doch waren sie weder konstant noch besonders ausgesprochen. Dagegen aktivierte das Serum der mit Diphtherietoxin vorbehandelten Tiere in den meisten Fällen Kobragift stärker als das der normalen (Tab. II). Auffallend war, daß diese verstärkte Reaktion besonders die Sera der mit subletalen Toxindosen behandelten überlebenden Meerschweinchen zeigten, während das Serum der mit letalen Toxindosen injizierten Tiere beinahe immer so wirkte, wie das der normalen.

Tabelle II.

	Zeit der Ablesung	15 Minuten						30 Minuten						1 Stunde						2 Stunden					
		Kobra-Lösung Menge																							
		0,005	0,01	0,05	0,1	0,3	0,3	0,005	0,01	0,05	0,1	0,3	0,3	0,005	0,01	0,05	0,1	0,3	0,3	0,005	0,01	0,05	0,1	0,3	0,3
1	Serum des normalen Meerschweinchens	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	Sp	Sp	θ	θ	θ	Sp	Sp	p	θ	θ	θ	p	fk	k	θ
2	Serum des mit letaler Dosis injizierten	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	Sp	p	θ	θ	θ	Sp	p	fk	θ	θ	θ	p	k	k	θ
3	Serum des mit subletaler Dosis injizierten	θ	θ	θ	Sp	Sp	θ	θ	θ	Sp	p	p	θ	θ	θ	fk	k	k	θ	θ	Sp	k	k	k	θ

Die Prüfung der Wirkungsweise von Organextrakten anderer Tierarten (Ratte, Kaninchen, Pferd) ergab ein dem von Organextrakten gesunder Meerschweinchen analoges Verhalten.

#### Versuche mit menschlichem Material.

Die der Leiche entnommenen Gewebe wurden ebenfalls in der schon beschriebenen Weise verarbeitet. Im ganzen wurden die Organe von 18 Leichen untersucht.

Die Todesursachen sind nach den Sektionsprotokollen des k. k. Rudolfsptales in Wien folgende:

I. Fall: Josef K., 57 J. Endocarditis chronica. Insufficiencia aortae, endarteritis chronica deformans aortae et arteriarum gravis cum dilatatione aneurysmatica arcus aortae. Hypertrophia et dilatatio cordis totius. Cicatrices cordis myomalaticae. Hyperaemia mechanica viscerorum. Cicatrices renum e arteriosclerosi: Pneumonia cruposa lobi inferioris dextri in stadio hepatisationis griseae Pleuritis fibrinosa.

II. Fall: Marie L., 54 J. Nephritis chronica. Pericarditis fibrinosa recens. Hypertrophia ventriculi cordis sin. cum dilatatione. Hyperaemia viscerum praecipue hepatis. Oedema universale.

III. Fall: Johann O., 41 J. Meningitis basilaris tbc. subacuta. Hydrocephalus acutus. Tbc. chronica glandularum lymphaticarum spatii retroperitonealis et ductus thoracici. Tbc. miliaris subacuta universalis. Adhaesiones pleuriticae ambilaterales.

IV. Fall: Therese P., 83 J. Encephalomalacia multiplex praecipue nuclei caudati. Pachymeningitis haemorrhagica inveterata. Endarteriitis chronica deformans aortae et arteriarum praecipue cerebri. Pneumonia lobularis confluens lobi superioris pulmonis dextri. Pleuritis fibrinosa bilateralis recens. Atrophia renum e arterio-sclerose. Marasmus senilis. Atrophia cerebri. Tbc. chronica obsoleta apicis pulmonis dextri.

V. Fall: Berta M., 40 J. Cirrhosis hepatis biliaris. Icterus gravis. Intumescencia lienis. Hydrops, Ascites. Lipomatosis cordis levioris gradus. Oedema cerebri. Pneumonia lobularis lobi inferioris utriusque.

VI. Fall: Rosalia M., 62 J. Hypertrophia et dilatatio cordis, praecipue ventriculi dextri. Emphysema pulmonum cum bronchitide catarrhali. Adenomata glandulae thyroideae. Compressio tracheae. Hyperaemia mechanica organorum. Oedema universale. Cystitis et pyelitis catarrhalis. Myomalacia cordis multiplex recens. Cicatrix ventriculi post ulcus pepticum.

VII. Fall: Johann H., 38 J. Tetanus. Hyperaemia cerebri et meningum gravis. Vulnus suppurans pollicis dextri. Lipomatosis cordis. Endocarditis chronica valvularum aortae cum insufficientia. Dilatatio cordis totius. Degeneratio parenchymatosa viscerum. Catarrhus ventriculi. Defectus digitorum pedis utriusque (probabiliter e congelatione).

VIII. Fall: Franz S., 26 J. Pyopneumothorax dexter e perforatione cavernae lobi superioris. Tbc. chronica pulmonum cum phthisi ulcerosa et fibrosa. Bronchopneumonia. Ulcera. Tbc. intestini tenuis subsequente peritonitide purulenta recenti.

IX. Fall: Leopoldine B., 40 J. Polyserositis. Concretio cordis cum pericardio totalis. Adhaesiones pleuriticae bilaterales callosae, praecipue lateris dextri. Perihepatitis chronica, perisplenitis et incrassatio peritonei parietalis et visceralis e peritonitide chronica. Hyperaemia mechanica viscerum praecipue hepatis, lienis et renum. Hydrops. Ascites. Atrophia myocardii chronica. Tuberculosis obsoleta apicis pulmonis dextri.

X. Fall: Josef W., 58 J. Actinomycosis processus vermiformis subsequente abscessu cavi Douglasii et abscessu psoatici lateris dextri. Cystitis catarrhalis. Pyelitis chronica bilateralis. Nephrolithiasis sinistra. Marasmus universalis. Tbc. obsoleta apicum pulmonum. Defectus partialis musculi pectoralis sinistri. Pes equinovarus bilateralis.

XI. Fall: Marie S., 71 J. Carcinoma vesicae felleae progrediens in lobo dextro hepatis. subsequente abscessu parietis anterioris abdominis e peritonitide purulenta diffusa recenti. Carcinoma secundarium glandularum lymphaticarum retroperitonealium et periportalium. Cholelithiasis. Diverticulum ductus choledochi in intestinum duodenum perforatum. Endarteritis chronica deformans cum dilatatione aortae ascendens. Marasmus. Icterus.

XII. Fall: Josef S., 39 J. Aneurysmata arcus aortae rami descendens et aortae thoracicae. Dilatatio aneurysmatica aortae descendens. Aortitis chronica. Compressio tracheae partis inferioris aneurysmato effecta et usura corporis vertebrae dorsalis IV et V. Bronchitis purulenta diffusa. Emphysema pulmonum gradus levioris. Hypertrophia et dilatatio ventriculi cordis dextri. Hyperaemia mechanica viscerum. Cicatrix praepatii. Orchitis fibrinosa gradus levioris.

XIII. Fall: Leopoldine G., 46 J. Carcinoma exulceratum medullare ventriculi curvaturae maioris perforans in colon transversum. Carcinoma secundarium glandularum lymphaticarum regionalium et retroperitonealium et carcinoma secundarium hepatis. Haemorrhagiae in tractum intestinale. Infarctus haemorrhagici pulmonum in suppuratione et pneumonia lobularis confluens bilateralis. Encephalitis et encephalomalacia cerebri, haemisphae sinistae lobi parietalis, gyri centralis posterioris et apicis. lobi temporalis sinistri, subsequente meningitide suppurativa ad convexitatem cerebri haemisphae sinistae.

XIV. Fall: Brigitta S., 70 J. Carcinoma ventriculi curvaturae minoris exulcerans late extensum. Carcinoma secundarium glandularum lymphaticarum regionalium et mediastini. Tbc. chronica, disseminata pulmonum. Adhaesiones pleuriticae. partim callosae. Infarctus pulmonis sinistri in suppuratione. Cysto-pyelonephritis ascendens. Marasmus.

XV. Fall: Josef S., 45 J. Nephritis chronica. Concretio cordis cum pericardio totalis. Hypertrophia cordis ventriculi sinistri gradus levioris. Degeneratio

adiposa myocardii. Hyperaemia mechanica viscerum. Oedema pulmonum et cerebri. Arthritis uratica multiplex.

XVI. Fall: Josef U., 48 J. Endarteritis chronica deformans valvularum aortae cum insufficientia aortae et arteriarum. Cicatrices myomaliticae cordis. Hypertrophia cordis totius. Infarctus inveteratus pulmonis dextri. Adhaesiones pleuriticae partim in calcificatione. Emphysema pulmonum. Hyperaemia mechanica viscerum.

XVII. Fall: Marie B., 46 J. Amyloidosis viscerum. Tbc. chronica pulmonum cum phthisi. Caries tuberculosa corporis vertebrarum dorsalium IV—VI subseque abscessu frigido. Ulcera tuberculosa laryngis.

XVIII. Fall: Antonie K., 47 J. Pneumonia cruposa pulmonis sinistri lobi inferioris in stadio hepatisationis griseae. Pneumonia cruposa lobi superioris pulmonis dextri in resolutione. Pleuritis fibrinosa bilateralis. Degeneratio parenchymatosa viscerum et cordis. Pyometra in utero septem dies post abortum.

Das Verhalten der Organextrakte bezüglich der Aktivierung der Kobra-Pferdebluthämolyse war fast in allen diesen Fällen das gleiche, so daß es genügt, die typischen Resultate einer Untersuchungsreihe anzuführen (Tab. III).

Tabelle III.

	Zeit der Ablesung	15 Minuten						30 Minuten						1 Stunde						2 Stunden					
		Kobra-Lösung Menge																							
		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0
	Organextrakt-Menge	0,005	0,01	0,05	0,1	0,3	0,3	0,005	0,01	0,05	0,1	0,3	0,3	0,005	0,01	0,05	0,1	0,3	0,3	0,005	0,01	0,05	0,1	0,3	0,2
1	Bauchspeicheldrüse	0	Sp	Sp	Sp	p	Sp	0	Sp	Sp	p	p	p	Sp	Sp	p	fk	k	fk	Sp	p	fk	k	k	fk
2	Leber	0	0	Sp	fk	fk	0	0	0	Sp	fk	fk	0	0	Sp	k	k	k	fk	Sp	p	k	k	k	0
3	Lunge	0	0	Sp	Sp	fk	0	0	0	Sp	p	fk	0	0	Sp	p	fk	k	0	0	Sp	fk	fk	k	0
4	Nebenniere	0	0	Sp	p	p	0	0	0	Sp	p	fk	0	0	Sp	p	fk	k	0	0	Sp	fk	k	k	0
5	Herz	0	0	Sp	p	fk	0	0	0	Sp	p	k	0	0	Sp	p	fk	k	0	0	Sp	fk	k	k	0
6	Muskel	0	0	Sp	Sp	p	0	0	0	Sp	p	fk	0	0	0	p	fk	k	0	0	Sp	fk	k	k	0
7	Hoden	0	0	Sp	p	p	0	0	0	p	p	fk	0	0	Sp	fk	k	0	0	Sp	k	k	k	k	0
8	Eierstock	0	0	Sp	Sp	p	0	0	0	Sp	p	fk	0	0	Sp	p	fk	k	0	0	Sp	fk	k	k	0
9	Milz	0	0	0	Sp	p	0	0	0	Sp	p	fk	0	0	0	p	fk	k	0	0	Sp	fk	k	k	0
10	Gehirn	0	0	0	Sp	Sp	0	0	0	Sp	p	p	0	0	0	p	fk	fk	0	0	0	fk	fk	fk	0
11	Niere	0	0	0	Sp	p	0	0	0	Sp	Sp	p	0	0	0	Sp	Sp	p	0	0	0	p	fk	fk	0
12	Serum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Sp	Sp	0	0	Sp	Sp	p	p	0
13	Fett	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	Sehnen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	Aorta	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	Dura mater	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Wie aus der oben angeführten Tab. III hervorgeht, sind die aktivierenden Eigenschaften in den einzelnen Geweben nicht in gleicher Menge enthalten. Am stärksten aktivierten in absteigender Reihe der Extrakte aus Leber, Lunge, Nebenniere, Herz, Muskel, Hoden und Eierstock; am geringsten war die aktivierende Wirkung des Milz-, Gehirn- und Nierenextraktes. Dagegen scheint den Extrakten von Fett, Sehnen, Aorta und Dura mater überhaupt jede aktivierende Fähigkeit zu fehlen.

Auch das Leichenblutserum besaß viel weniger aktivierende Substanzen als die Gewebeertrakte. Nur die Sera dreier an Carcinom und eines an Cirrhosis hepatis verstorbenen Menschen aktivierten die Kobra-

hämolyse in erheblich stärkerem Maße, als die der anderen (Tab. IV), was ja mit den von Kraus, v. Graff und Ranzi mitgeteilten Resultaten übereinstimmt.

Tabelle IV.

Zeit der Ab- lesung	15 Minuten						30 Minuten						1 Stunde						2 Stunden					
	Kobra-Lösung Menge																							
Serum Menge	0,005	0,01	0,05	0,1	0,3	0,3	0,005	0,01	0,05	0,1	0,3	0,3	0,005	0,01	0,05	0,1	0,3	0,3	0,005	0,01	0,05	0,1	0,3	0,3
1 Serum von dem Fall mit Cir- rhosis hepatis	θ	p	fk	k	k	θ	Sp	p	fk	k	k	θ	Sp	fk	k	k	k	θ	p	k	k	k	k	θ
2 Serum von den 3 Fällen mit Carcinom	θ	θ	θ	θ	Sp	θ	θ	θ	θ	Sp	p	θ	θ	θ	Sp	p	fk	θ	θ	Sp	p	fk	k	θ
3 Serum von ande- ren Fällen	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	Sp	Sp	θ	θ	Sp	Sp	p	p	θ

Zusammenfassend geht aus diesen Untersuchungen hervor, daß sowie im Serum auch in Organen Kobragift aktivierende Substanzen vorhanden sind. Die Aktivatoren der Organe dürften quantitativ verschieden sein von denjenigen des Serums. Die verschiedenen Organe enthalten verschiedene Mengen aktivierender Substanzen.

Verschiedene pathologische Prozesse ändern nicht wesentlich den Gehalt der Organe an Kobragift aktivierenden Substanzen.

Interessant ist das Verhalten des Pankreasextraktes (Tab. III), indem es wie bekannt schon an und für sich ohne Anwesenheit des Schlangengiftes Pferdeblutkörperchen löst, aber auch stärker aktiviert als andere Organe. Es dürften somit außer den aktivierenden noch hämolytisch wirkende Substanzen im Pankreasextrakt enthalten sein.

Endlich muß noch erwähnt werden, daß die aktivierenden Eigenschaften der Extrakte an die bei Erwärmung auf 50° ausfallenden Niederschläge gebunden sind, während die überstehende Flüssigkeit allein völlig indifferent ist. Es läßt sich dies durch einen ganz einfachen Versuch beweisen: Zentrifugiert man nämlich die nach der Inaktivierung stärker getrübten Extrakte, so erhält man einen klaren Anteil, der gar keine oder eine kaum nachweisbare aktivierende Wirkung auf die Kobra-hämolyse ausübt, während das Sediment mit der entsprechenden Menge physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, in der Wirkung der beide Teile, d. h. klare Flüssigkeit und Sediment enthaltenden Emulsion, völlig gleichkommt. Das gleiche Resultat erhält man, wenn man den Niederschlag durch ein gewöhnliches Papierfilter aus der Emulsion entfernt. Daraus ergibt sich somit die Notwendigkeit, bei den Versuchen die inaktivierten Extrakte gut durchzuschütteln, um eine möglichst feine Verteilung des Niederschlages zu erzielen.

**Literatur.**

Bauer u. Lehndorff. Wien. med. Wochenschr. 1909. No. 28; Folia serolog. Bd. 3. H. 3. — Beyer, München. med. Wochenschr. 1909. No. 43. — Calmette, Massol et Guérin, Compt. rend. des séanc. de l'Acad. de Scienc. 25. Mai 1908. — Flexner u. Noguchi, Journ. of experim. Med. Vol. 6. 1902. No. 3. — Heynemann, Arch. f. Gyn. 1910. — Ivar Bang, Biochem. Zeitschr. Bd. 11, 18. — Kawamura, Die Cholesterinester-Verfettung. Jena 1911. — Klein, Wien. klin. Wochenschr. 1901. — Korschun u. Morgenroth. Berlin. klin. Wochenschr. 1902. — Kraus, v. Graff u. Ranzi, Wien. klin. Wochenschr. 1911. — Kyes, Berlin. klin. Wochenschr. 1902. — Metschnikoff, Annal. de l'Inst. Pasteur. 1899. — Pascucci, Beitr. z. chem. Physiol. Bd. 6. — Schibayama, Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Bd. 30. — Tarasewitsch, Annal. de l'Inst. Pasteur. 1902.

*Nachdruck verboten.*

## Das Verhalten des opsonischen Komplementes und der Antikörper bei der Anaphylaxie.

[Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institut in Wien  
(Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf).]

Von Dr. **St. Bäcker** (Wien) und Dr. **T. Wakushima** (Tokyo).

Seit den Untersuchungen von Cowie und Chapin, von Hata, Hektoen, Rosenthal wird das Komplement zumeist mit dem Opsonin des normalen Serum resp. mit dem thermolabilen Anteil desselben identifiziert. Nach den Angaben von Sleeswijk, Friedemann, Michaelis und Fleischmann, von Friedberger und Hartoch ist im anaphylaktischen Anfall ein Schwinden des Komplementes nachweisbar. In Uebereinstimmung hiermit gelang nun Scott die Feststellung, daß im anaphylaktischen Anfall auch das opsonische Komplement verschwinde. Die gegenteilige Angabe Nadejdes aber, daß bei der Reinjektion anaphylaktischer Meerschweinchen nur das (lytische) Komplement, und zwar eventuell völlig schwinde, das normale Opsonin aber vollkommen erhalten bleibe, müßte folgerichtig als ein neues Argument für die besonders von Fernet und Porter behauptete Nichtidentität beider Körper gelten. Bei der theoretischen Bedeutung dieser Frage schien uns zunächst eine Nachprüfung der Angabe Nadejdes wünschenswert. Im Anschluß daran aber sollte sich Gelegenheit ergeben, die besonders von Biedl und Kraus vielfach festgestellte Uebereinstimmung der experimentellen Peptonvergiftung des Hundes mit dem echten anaphylaktischen Shock nach einer von ihnen noch nicht erforschter Richtung zu untersuchen.

Aber auch zur Lösung einer weiteren interessanten theoretischen Frage schien uns die gewählte Fragestellungsmethode geeignet, nämlich: zur Differenzierung des Opsonins und des Bakteriotropins. Hatte doch Joachimoglu zur weiteren Stützung der theoretischen Auffassung Friedbergers den Nachweis geführt, daß der anaphylaktische Shock überdies mit einer Konsumtion der Präzipitine verbunden sei, während die anderen Antikörper, soweit er sie als Agglutinine und Hämolytine untersuchte, erhalten bleiben. Dieses differente Verhalten war schon im Hinblick auf die von Doerr und seinen Mitarbeitern entwickelte Identitätstheorie aller Antikörper von großem Interesse, und eine Nach-

prüfung der bisher nicht genügend gewürdigten Befunde Joachimoglus daher recht wünschenswert. Auch hatte letzterer die Bakteriotropine nicht in den Bereich seiner Untersuchungen einbezogen. Wenn aber, wie zu erwarten, auch diese Antikörper sich bei der anaphylaktischen Vergiftung so verhalten wie alle anderen außer den Präzipitinen, d. h. wenn die phagocytosefördernde Fähigkeit des erhitzten Immunserrums im Anfall intakt bleibt, mußten sie sich wohl vom Opsonin, falls dieses wie das lytische Komplement schwindet oder mindestens durch Verlust seines komplementartigen Anteiles unwirksam wird, auf diese Weise differenzieren lassen.

Unsere Untersuchungen erstreckten sich somit auf folgende Fragen:

I. Verschwindet nach der Reinjektion anaphylaktischer Meerschweinchen das Opsonin des normalen, aktiven Serums ebenso wie das hämolytische Komplement?

II. Besteht auch bezüglich des Opsoningehaltes die volle Uebereinstimmung der Peptonvergiftung des Hundes mit dem anaphylaktischen Shock?

III. Bleiben nach der Reinjektion anaphylaktischer, außerdem aber gegen Bakterien immunisierter Meerschweinchen die Antikörper (außer den Präzipitinen), nämlich Agglutinine und im besonderen die Bakteriotropine des inaktivierten Serums erhalten?

Ehe wir auf die Besprechung unserer Versuche und deren Resultate im einzelnen eingehen, müssen wir aber noch einige kurze Bemerkungen über die von uns durchgeführte Methodik des Nachweises der Opsonine und der Bakteriotropine vorausschicken. Auf eine Kritik der beiden Untersuchungsmethoden werden wir jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht eingehen, immerhin bot sie uns reichlich Gelegenheit, die von dem einen von uns (Bächer) schon mehrfach dargelegten kritischen Gesichtspunkte einer neuerlichen eingehenden Prüfung zu unterziehen. Wir können wohl auch, da wir uns in allem wesentlichen an die bezüglichen Vorschriften Wrights resp. Neufelds hielten, den Gang der Technik im allgemeinen als bekannt voraussetzen. Besondere Bedingungen der einzelnen Versuche werden natürlich noch im Verlauf der Einzelbesprechung ihre Erläuterung finden. Folgende Punkte aber scheinen uns im voraus Erwähnung zu verdienen:

1) Nach mehreren Vorversuchen haben wir für unsere eigentliche Untersuchung ausschließlich lebende Bakterienaufschwemmungen von 24-stündigen Schiefagarkulturen verwendet. Durch die Abtötung (Erhitzung) schien uns mindestens das färberische Verhalten der phagocytierten Bakterien verschlechtert.

2) Das erforderliche Blut wurde bei den Hunden und Meerschweinchen gewöhnlich aus dem Ohre, unmittelbar vor der intravenösen Reinjektion oder Peptoneinspritzung aus der Jugularis, bei den sterbenden Tieren aber (nach der Reinjektion) aus dem rechten Ventrikel des Herzens entnommen.

3) Die Leukocyten stammten stets von homologen, normalen Tieren, für die Opsoninversuche aus Blut, für die Bakteriotropinprüfungen aus Peritonealexsudat. Als Citratlösung diente die von Sauerbeck angegebene physiologische.

4) Bei der Feststellung der „phagocytischen Zahl“ gingen wir so vor, daß wir die aus 50 Leukocyten, die nicht in größeren Gruppen als zu drei beisammenlagen, erhaltene Zahl mit der aus 50 anderen, die der



gleichen Bedingung genügten, gewonnenen verglichen. War die Differenz nicht beträchtlich, wie zumeist, so wurde der Durchschnitt als „phagocytische Zahl“ des Präparates betrachtet. Im anderen Falle wurden weitere 100 möglichst freiliegende Leukocyten durchgezählt, und ihre Bakterienzahl mit der der ersten 100 verglichen resp. der Durchschnitt genommen. Eventuell gingen wir in dieser Weise noch weiter und verwendeten erst den Durchschnitt der aus zwei Gruppen zu je 200 Leukocyten erhaltenen Indices. In einigen Versuchen wurden auch die auf zwei Parallelpräparaten in 50 resp. 100 Leukocyten gewonnenen Zahlen zur Durchschnittsberechnung benützt. Wir müssen erwähnen, daß wir nach diesem System bei guten Präparaten stets dazu gelangten, aus zwei verschiedenen Leukocytengruppen desselben oder auch verschiedener Ausstriche höchstens um 20 Proz. differierende Zahlen zu erhalten, und glauben hiermit eine weitgehende Kontrolle unserer Zählungsergebnisse eingeführt zu haben. Allerdings haben unsere Opsoninversuche durchweg höhere phagocytische Zahlen ergeben, als sie von Wright zugelassen werden. Dies kann an der längeren Inkubierung der Gemische (30 Minuten) und an der größeren Dichte der Aufschwemmungen liegen. Wir verwendeten bei Staphylokokken wie bei Typhusbakterien 10-fache Verdünnungen einer Aufschwemmung einer gut gewaschenen Agarkultur in 5,0 ccm Kochsalzlösung. Einen Nachteil für das Versuchsergebnis konnten wir aber, abgesehen von der größeren Mühe des Zählens in den höheren Zahlenwerten, um so weniger finden, als nur solche die Möglichkeit zu deutlichen Ausschlägen nach abwärts, wie wir sie erwarteten, boten.

5) Auch bei den Bakteriotropinversuchen haben wir Aufschwemmungen der oben angegebenen Dichte mit Erfolg verwenden können. Sie gestatteten uns überdies, die von dem einen von uns als Kontrolle dieser Methode immer empfohlene Zählung des Phagocytenprozentes durchzuführen. Auf die Anführung der hierbei erhaltenen Zahlen glaubten wir aber verzichten zu sollen, um die Uebersicht nicht durch die kleinen unvermeidlichen Abweichungen im einzelnen zu stören. Es bedeutet aber in unseren Tabellen die Bezeichnung:

gering:	bis 10 Proz.	phagocytierende Leukocyten	
mäßig:	10—20	„	„
stark:	20—50	„	„
sehr stark:	mehr als 50 Proz.	„	„

## I.

Verschwindet nach der Reinjektion sensibilisierter Meerschweinchen das normale Opsonin?

Zur Untersuchung gelangten in dieser Versuchsreihe sensibilisierte Meerschweinchen von mehr als 300 g, die einen Monat vorher einige Milligramm Diphtheriepferdeserum subkutan erhalten hatten, und ebenso große Kontrolltiere. Die Reinjektion erfolgte intravenös mit normalem Pferdeserum. Vielfache frühere Untersuchungen hatten uns überzeugt, daß das Opsonin normaler Meerschweinchen für Staphylokokken eine annähernd konstante Größe darstellt, es erübrigte aber noch in Versuchen und Kontrollen die Feststellung, wie sich normale Tiere bei der intravenösen Injektion entsprechender Mengen von Pferdeserum und wie sich sensibilisierte Meerschweinchen an sich, d. h. vor der Reinjektion bezüglich ihres opsonischen Index verhalten. Mehrere diesbezügliche Untersuchungen haben übereinstimmend zu dem Ergebnis geführt, daß

zwar die primäre intravenöse Einspritzung von normalem Pferdeserum in Mengen bis zu 1,0 ccm zunächst so gut wie ohne Einfluß auf den Opsoningehalt des Serums unbehandelter Meerschweinchen bleibt, daß aber die anaphylaktischen Tiere an sich Opsoninwerte zeigen, die manchmal sogar wesentlich unter denen normaler Kontrollen liegen. Diese Beobachtung, die vielleicht an die Mitteilung Turans erinnert, der bei Tuberkulinbehandelten und für Tuberkulin anaphylaktischen Meerschweinchen stets einen erniedrigten tuberkuloopsonischen Index fand, führte uns zu der Ueberzeugung, daß für die Beantwortung unserer Frage nur der Vergleich der Opsoninwerte ein und desselben Tieres vor und nach der Reinjektion in Betracht kommen könne. Von mehreren Versuchen, die analoge Resultate ergaben, zitieren wir nur den folgenden (Versuch I), in dem alle hier besprochenen Verhältnisse, aber auch die Lösung unserer Aufgabe in überzeugender Weise zur Darstellung gelangen.

Tabelle I.

Opsonischer Versuch bei anaphylaktischen Meerschweinchen.  
Opsonischer Index (O. I.) für Staphylokokken. Ph. I. phagocytische Zahl.

Meerschweinchen No.:		sensibilisiert			normal		Spontanphagocytose
		I	II	III	a	b	
Serumentnahme	Pferdeserum intravenös	0,2	0,5	1,0	1,0	1,0	—
unmittelbar vor der Inj.	Ph. I.	12,0	19,5	15,5	19,6	17,4	0,12
	O. I.	0,65	1,05	0,84	1,05	0,94	0,0065
unmittelbar einige Min.) (nach der Inj.)	Ph. I.	3,0	9,4	9,1	19,3	16,0	—
	O. I.	0,16	0,51	0,49	1,04	0,86	—

Die beiden als Kontrollen herangezogenen, normalen Meerschweinchen zeigen zunächst untereinander vor jeder Behandlung keine wesentliche Differenz. Der Durchschnitt ihrer phagocytischen Zahlen, gleich 1 gesetzt, war die Basis zur Berechnung der opsonischen Indices im ganzen Versuche. (Analog wurde in den späteren Versuchen verfahren.) Auch durch die intravenöse Injektion von 1,0 ccm Pferdeserum erfuhr der opsonische Index dieser Tiere keine merkliche Beeinflussung, obwohl ihr Allgemeinbefinden durch die Einspritzung deutlich alteriert worden war. Dagegen sind die opsonischen Werte bei den sensibilisierten Meerschweinchen schon vor der Reinjektion von den normalen teilweise stark abweichend, noch viel beträchtlicher aber wird diese Differenz nach dieser, die übrigens bei allen Tieren unter typisch anaphylaktischen Symptomen zum Tode führte. Bei diesen 3 Meerschweinchen konstatieren wir einen förmlichen Sturz des Opsonintiters und erhalten bei allen 3 Tieren Werte, die unter dem Minimum vor der Reinjektion liegen. Nur in einem Falle scheint allerdings ein fast völliges Schwinden der opsonischen Kraft erfolgt zu sein — Sinken bis nahe zum Wert der Spontanphagocytose — doch stimmt auch dies mit dem Verhalten des hämolytischen Komplementes überein, das ebenfalls nur partiell aufgebraucht zu werden pflegt. In Beantwortung unserer ersten Frage müssen wir demnach die Angabe Scotts, daß der anaphylaktische Shock mit einem Schwinden des opsonischen Komplementes einhergehe, durchaus bestätigen. Die gegenteiligen Ergebnisse

Nadejdes aber können ihre Erklärung am ehesten in dem teilweisen Erhaltenbleiben des Opsoningehaltes finden, indem bei den Schwierigkeiten der Technik die Differenz nicht festgestellt werden konnte.

## II.

Verschwindet bei der Peptonvergiftung des Hundes das normale Opsonin ebenso wie im anaphylaktischen Shock?

Die experimentellen Untersuchungen von Biedl und Kraus, von Achard und Aynaud haben in der Vergiftung des Hundes mit Witte-Pepton in so vielen Richtungen ein völliges Analogon des anaphylaktischen Anfalles kennen gelehrt, daß wir eine positive Beantwortung unserer Frage wohl mit Grund erwarten konnten. Immerhin mußte der experimentelle Nachweis nicht nur als ein weiteres Argument der funktionellen Identität beider Vorgänge, sondern auch als Ergänzung unserer vorhergehenden Untersuchungen wertvoll erscheinen.

Tabelle II.

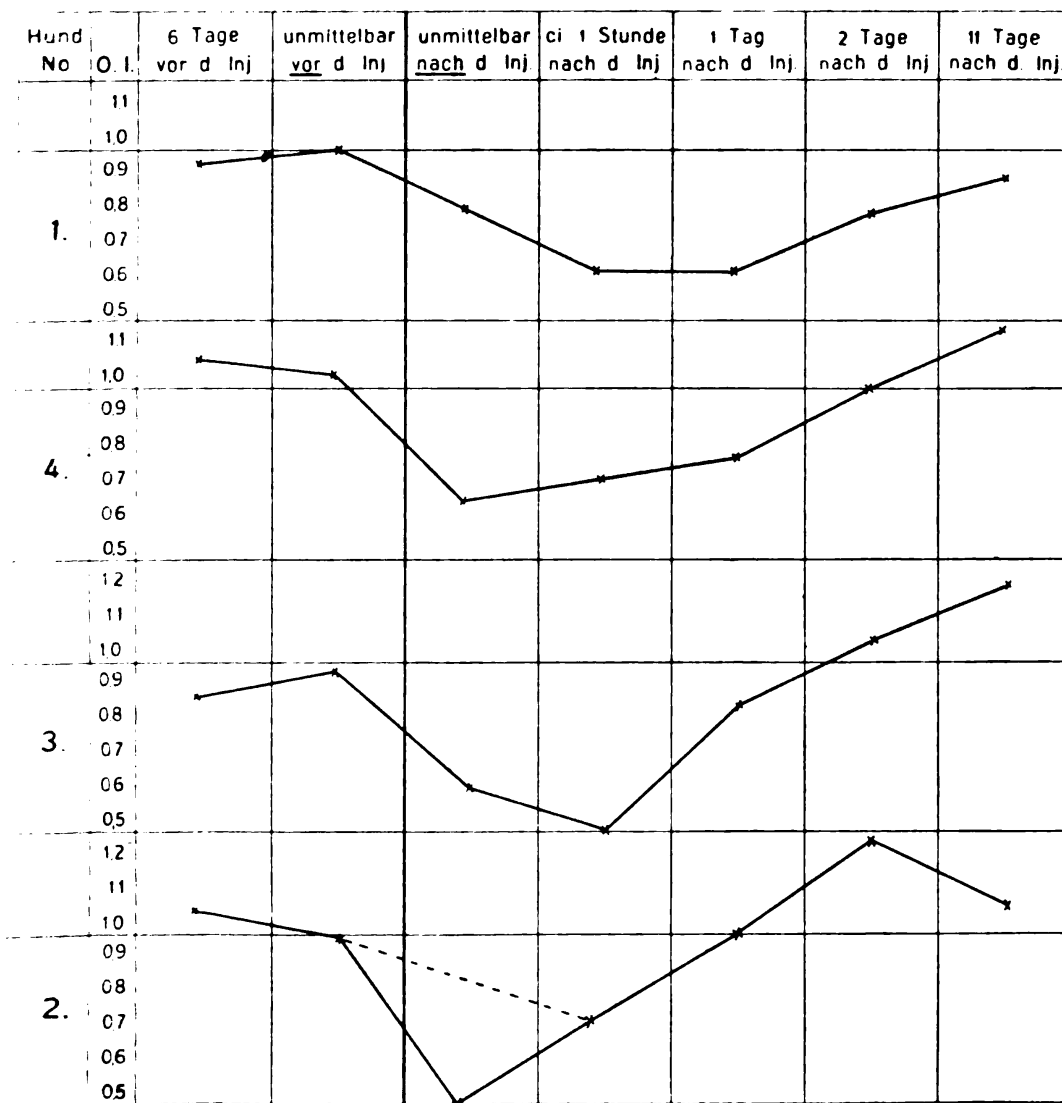
Uebersichtstabelle über die opsonischen Versuche bei peptonvergifteten Hunden.  
Opsonischer Index (O. I.) für Staphylokokken.

Hund No.:		1	4	3	2	5	Spon- tan- phago- cytose	Berechnung des opsonischen Index
Injizierte Peptonmenge in g pro kg Gewicht		0,3	0,2	0,1	0,05	0	—	
6 Tage vor der Peptoninjektion	Ph. I. O. I.	6,1 0,96	6,8 1,07	5,7 0,90	6,8 1,07	— —	— —	O. I. 1,0 = Durch- schnitt der Ph. I. (1.—4.) = Ph. I. 6,35
unmittelbar vor der Peptoninjekt.	Ph. I. O. I.	11,2 1,01	11,6 1,04	10,8 0,97	10,9 0,98	— —	0,32 0,028	O. I. 1,0 = Durch- schnitt der Ph. I. (1.—4.) unmittel- bar vor der Peptoninjektion Ph. I. 11,10
unmittelbar nach der Peptoninjekt.	Ph. I. O. I.	8,9 0,81	7,7 0,69	7,2 0,64	5,2 0,47	— —	— —	
ca. 1 Stunde nach der Peptoninjekt.	Ph. I. O. I.	7,2 0,64	8,4 0,75	5,1 0,46	8,2 0,73	— —	— —	
1 Tag nach der Peptoninjektion	Ph. I. O. I.	8,4 0,66	10,1 0,80	11,1 0,87	12,6 1,0	12,6 1,0	0,98 0,07	O. I. 1,0 = Ph. I. d. Kontrollhundes 5.
2 Tage nach der Peptoninjektion	Ph. I. O. I.	6,3 0,79	7,96 1,01	8,34 1,06	10,1 1,28	7,86 1,0	0,36 0,04	dgl.
11 Tage nach der Peptoninjektion	Ph. I. O. I.	11,0 0,92	14,0 1,16	14,7 1,22	12,9 1,08	12,0 1,0	0,84 0,07	"

Auch in diesen Versuchen haben wir die Bestimmung des opsonischen Index gegenüber Staphylokokken gewählt. Da es uns möglich war, dieselbe an den gleichen Tieren wiederholt vor und auch nach der Peptoneinspritzung durchzuführen, können wir auf unserer Uebersichtstabelle (Tab. II) resp. auf den daraus gewonnenen Kurven (Tab. III) nicht nur den Einfluß der Peptonvergiftung, sondern auch die Grenzen der spontanen Differenzen zwischen verschiedenen Tieren, wie auch der natürlichen Schwankungen, denen der Opsoningehalt ohne besonderen Eingriff unterliegt, zur Darstellung bringen. Bei allen 4 Hunden führte die injizierte Peptonmenge (0,05—0,3 g in 10-proz. Lösung pro Kilo-

gramm intravenös) zu mehr oder weniger schweren Symptomen, bei keinem aber zum tödlichen Ausgang, so daß wir auch die Restitution des Opsonintiters verfolgen konnten. Da uns die vorhergehenden Bestimmungen an den noch unbehandelten Tieren gezeigt hatten, daß die Unterschiede bei normalen Hunden sich in recht engen Grenzen halten, glaubten wir uns für die Berechnung des opsonischen Index der peptonvergifteten Hunde bei den späteren Bestimmungen mit einem einzigen Kontrolltiere begnügen zu dürfen. Immerhin scheint diese Basis nicht vollkommen ausreichend gewesen zu sein, einzelne auffällige Werte wären sonst wohl nicht vorgekommen.

**Tabelle III.**  
Kurven der opsonischen Indices (O.I.) bei peptonvergifteten Hunden.  
O. I. für Staphylokokken.



Eines aber geht aus unseren Versuchen mit voller Exaktheit hervor: auch beim peptonvergifteten Hunde erfolgt ein ausgesprochenes Sinken des Opsonintiters. Größe und Dauer dieses Ausschlages sind, wie sich zeigt, nicht nur von der Injektionsdosis, sondern wie auch andere

Symptome auch von der Individualität der Tiere abhängig. In jedem Falle aber überschritt das Ausmaß dieser negativen Phase bei weitem die spontan vorkommenden Schwankungen. In 1—2 Tagen gleichzeitig mit dem Schwinden der anderen Krankheitserscheinungen scheint der Opsoningehalt im allgemeinen wieder zur Norm zurückzukehren. Allerdings scheint manchmal nicht nur eine Restitution des normalen Wertes, sondern sogar eine gewisse Ueberproduktion des Opsonin einzutreten.

Unsere Untersuchungen haben somit unseren Erwartungen entsprechend auch im Hinblick auf das Verhalten des opsonischen Index die völlige Uebereinstimmung der experimentellen Peptonvergiftung des Hundes mit dem anaphylaktischen Shock erwiesen.

### III.

Bleiben bei der Reinjektion anaphylaktischer, immunisierter Meerschweinchen die Antikörper, insbesondere die Bakteriotropine, erhalten?

Es schien uns vorteilhafter, diese Untersuchungen mit Typhusbakterien durchzuführen, konnten wir doch bei diesen viel leichter und sicherer nachweisbare Antikörperproduktion erwarten als bei Staphylokokken. Wir haben daher 6 Meerschweinchen, die vorher einige Milligramme Diphtherie-Pferdeserum subkutan erhalten hatten, im Verlauf eines Monats 4mal mit steigenden Mengen abgetöteter Typhusbacillen gespritzt. Die Anfangsdosis betrug 0,5 ccm von einer Aufschwemmung einer 24-stündigen Agarkultur in 5,0 ccm physiologischer Lösung, demnach  $\frac{1}{10}$  Kultur. Die Enddosis 4,0 ccm einer solchen Aufschwemmung, mithin  $\frac{8}{10}$  Kultur. Die Tiere 1, 2 und 3 wurden intraperitoneal, 4, 5 und 6 subkutan behandelt. Vor der 3. und 4. Injektion wurde allen Tieren etwas Blut vom Ohr entnommen und auf Agglutinine ( $\frac{1}{50}$ ) geprüft. Bei der ersten Entnahme waren solche überhaupt nicht, bei der zweiten nur spurenweise nach 24 Stunden nachweisbar. Eines der intraperitoneal immunisierten Tiere (No. 1) ging nun am Tage nach der 4. Injektion ein, bei den übrigen wurde 7 Tage später ein dritter Probeaderlaß gemacht, und diesmal war in allen Seris bis mindestens  $\frac{1}{100}$  Agglutination zu konstatieren (s. Tab. V). Am nächsten Tag wurden den Tieren nochmals kleine Blutmengen abgenommen und auf Opsonin- und Bakteriotropingehalt geprüft (s. Tab. IV und VI). Der opsonische Index zeigte durchweg eine geringe Erhöhung gegenüber dem Durchschnitt von zwei normalen Tieren, doch können wir mangels größerer Vergleichsreihen nicht mit Sicherheit behaupten, daß solche Differenzen bei Typhus nicht in den Rahmen normaler Schwankungen fallen. Es bleibe also dahingestellt, ob Immunopsonine, d. h. komplex gebaute, komplettierbare Antikörper gebildet worden waren, sicher aber enthielten alle Sera meist noch in der Verdünnung  $\frac{1}{50}$  nachweisbare Bakteriotropine, d. h. thermostabile, einfach gebaute phagocytosefördernde Antikörper. Bei inaktiviertem, normalem Serum war nämlich nur bis zur Verdünnung  $\frac{1}{10}$  eine Beeinflussung der Phagocytose zu konstatieren.

Drei Tage später wurde die Reinjektion mit Pferdeserum vorgenommen. Sämtliche sensibilisierten Tieren, die 0,2—1,0 ccm intravenös erhielten, starben binnen wenig Minuten unter typischen Symptomen, zwei normale Kontrolltiere aber, denen je 1,0 ccm eingespritzt wurde, zeigten wieder nur vorübergehende, nicht charakteristische Schwäche und erholten sich rasch völlig. Bei allen Tieren wurde unmittelbar vor der intravenösen Injektion aus der Vene, dann bei den anaphylaktischen

Tieren in der Agone aus dem noch schlagenden Herzen, bei den Kontraktieren nach entsprechender Zeit aus dem Ohre Blut entnommen. Die Sera wurden sofort auf Opsonine, am nächsten Tag auf Agglutinine und Bakteriotropine untersucht.

Die Opsoninprüfung (Tab. IV) bestätigte in ganz eindeutiger Weise unsere schon mit Staphylokokken bei nicht immunisierten Tieren erhaltenen Resultate.

Tabelle IV.

Opsonischer Versuch bei anaphylaktischen, immunisierten Meerschweinchen.  
Opsonischer Index (O. I.) für Typhusbakterien.

Meerschw. No.:		sensibilisiert und immunisiert					normal		Spon- tan- phago- cytose	Berechnung des opsonischen Index
Serum- entnahme	Pferde- serum iv.	2	3	4	5	6	a	b		
		0,5	1,0	0,2	0,5	1,0	1,0	1,0	—	
3 Tage vor der Injektion	Ph. I. O. I.	10,7 1,28	9,0 1,08	10,3 1,24	10,6 1,28	10,1 1,22	8,1 0,98	8,4 1,02	— —	O. I. 1,0 = Durch- schnitt von a) u. b)
Unmittelbar vor der Injektion	Ph. I. O. I.	5,0 0,74	8,0 1,19	5,3 0,79	7,2 1,07	9,0 1,33	6,3 0,93	7,2 1,07	0,12 0,017	
Unmittelbar (einige Min.) nach der Inj.	Ph. I. O. I.	2,2 0,32	5,0 0,74	2,1 0,30	2,4 0,36	5,8 0,86	6,9 1,03	7,2 1,07	— —	O. I. 1,0 = Durch- schnitt von a) u. b) unmittelbar vor der Injektion

Tabelle V.

Agglutinationsversuch bei anaphylaktischen, immunisierten Meerschweinchen.  
2 Stunden bei 37°. Typhusbakterien.

Meerschw. No.		2	3	4	5	6	Normales Tier
Serum- entnahme	Pferdeserum intravenös	0,5	1,0	0,2	0,5	1,0	θ
4 Tage vor der Injektion	1/20	+++	+++	++	+++	+++	—
	1/50	++	++	+	++	++	θ
	1/100	+	+	+	+	+	θ
	1/200	—	—	—	—	+	θ
Unmittelbar vor der Injektion	1/20	+++	+++	+++	+++	+++	—
	1/50	++	+	+++	++	++	θ
	1/100	++	+	++	+	++	θ
	1/200	+	—	++	+	+	θ
Unmittelbar nach der Injektion	1/20	+++	+++	+++	+++	++	—
	1/50	++	+++	++	++	++	θ
	1/100	++	++	++	+	+	θ
	1/200	+	+	+	+	+	θ

+++ Vollkommene Klärung der Flüssigkeit.

++ Starker Niederschlag, doch noch Trübung der Flüssigkeit vorhanden.

+ Deutlicher Niederschlag.

— Spurenweiser Niederschlag.

Bei allen sensibilisierten Meerschweinchen erfolgte ein förmlicher Sturz des Opsonintiters, während der nicht vorbehandelter Tiere fast



unverändert bleibt. Wie erwähnt, haben wir es nicht entschieden, ob diese Einbuße an Wirksamkeit des aktiven Serums nur auf dem Schwinden der normalen Opsonine, oder auch auf dem Unwirksamwerden komplex gebauter Immunopsonine infolge Verbrauches des erforderlichen Komplementes beruht.

Wie die vorstehende Tabelle (Tab. V) zeigt, bleiben dagegen die Agglutinine im anaphylaktischen Shock erhalten, geringfügige Schwankungen finden wohl nach beiden Seiten statt, sie haben aber gewiß keinen kausalen Zusammenhang mit der Anaphylaxie. Unser Versuch bestätigt somit vollkommen die Angabe Joachimoglus über das Verhalten der Agglutinine.

Weiterhin aber wurden die Sera auch inaktiviert und ihre bakteriotrope Wirksamkeit festgestellt (Tab. VI). Bemerkenswerterweise ergab sich keine irgendwie nennenswerte Aenderung ihrer diesbezüglichen Fähigkeiten unter dem Einfluß der anaphylaktischen Vergiftung.

Tabelle VI.

Bakteriotroper Versuch bei anaphylaktischen, immunisierten Meerschweinchen.  
Typhusbakterien. Ausstriche nach  $\frac{1}{2}$  Std. bei 37°.

Meerschw. No.		2	3	4	5	6	norm. a	norm. b	ohne Serum
Serum- entnahme	Pferdeserum intravenös	0,5	1,0	0,2	0,5	1,0	1,0	1,0	—
3 Tage vor der Injektion	$\frac{1}{10}$	stark	stark	stark	stark	stark	stark	—	gering
	$\frac{1}{20}$	"	"	"	"	mäßig	mäßig	—	—
	$\frac{1}{50}$	"	stark?	"	mäßig	mäßig	gering	—	—
Unmittelbar vor der Injektion	$\frac{1}{10}$	mäßig	stark	"	stark	stark	mäßig	mäßig	gering
	$\frac{1}{20}$	stark	"	"	"	gering	gering	gering	—
	$\frac{1}{50}$	sehr st.	"	"	sehr st.	"	gering	"	—
Unmittelbar nach der Injektion	$\frac{1}{10}$	stark	"	"	"	sehr st.	"	"	—
	$\frac{1}{20}$	"	"	stark?	stark	mäßig	"	"	—
	$\frac{1}{50}$	"	"	"	"	stark?	"	"	—

Die Bakteriotropine bleiben demnach wie die Agglutinine unverändert wirksam. Wir haben hiermit im Sinne Neufelds ein neues unterscheidendes Kriterium der Tropine gegenüber den Opsoninen, insbesondere auch gegenüber eventuell vorhandenen Immunopsoninen festgestellt, da nur letztere beim anaphylaktischen Shock durch den Komplementschwund unwirksam werden. In Kürze möchten wir noch auf den im einzelnen merklich verschiedenen Gehalt der Sera an Agglutininen einerseits, an Bakteriotropinen andererseits hinweisen, was uns in Hinblick auf die Identitätsfrage der Antikörper auch nicht ohne Belang zu sein scheint.

### Zusammenfassung.

1) Bei der Reinjektion anaphylaktischer Meerschweinchen verschwindet das Opsonin des normalen Serums ebenso wie das lytische Komplement. Die Auffassung, daß beide Körper resp. der thermolabile Teil des Opsonins und das Komplement identisch sind, erhält damit eine neue Stütze.

2) Auch bei der Peptonvergiftung des Hundes wird das normale Opsonin verbraucht. Sie ist somit auch in dieser Hinsicht ein völliges Analogon der anaphylaktischen Vergiftung.

3) Bei der Reinjektion anaphylaktischer und gegen Bakterien immunisierter Meerschweinchen verschwinden zwar die im aktiven Serum wirksamen opsonischen Kräfte (Normalopsonin oder Komplement des Immunopsonins), nicht aber die im inaktivierten Serum nachweisbaren phagocytosebefördernden Substanzen, die Bakteriotropine. Ebenso bleiben die Agglutinine erhalten.

#### Literatur.

- Achard et Aynaud, Compt. rend. d. l. soc. d. Biol. T. 67. p. 83.  
 Bäcker, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 56. 1907. p. 33.  
 Biedl u. Kraus, Wien. klin. Wochenschr. 1909. p. 363.  
 — — Handb. d. Techn. u. Method. d. Immunforsch. Erg.-Bd. I. p. 255.  
 Cowie u. Chapin, Journ. of med. Res. Boston. Vol. 17. p. 57 u. 95, Vol. 19. p. 213.  
 Doerr, Handb. d. Techn. u. Method. d. Immunforsch. Bd. 2. p. 856.  
 Fleischmann und Michaelis, Med. Klin. 1906. p. 21.  
 Fornet u. Porter, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 48. p. 461.  
 Friedberger u. Hartoch, Zeitschr. f. Immunf. Bd. 3. H. 6. p. 581.  
 Hata, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 61. p. 81.  
 Hektoen, Journ. of inf. Dis. Vol. 5. p. 240.  
 Joachimoglu, Zeitschr. f. Immunf. Bd. 8. p. 453.  
 Nadejde, Compt. Rend. d. l. soc. d. Biol. T. 70. p. 288.  
 Neufeld, Handb. d. path. Mikroorg. v. Kolle u. Wassermann. Erg.-Bd. 2. p. 303.  
 Rosenthal, Med. Klin. 1908. p. 1724.  
 Sauerbeck, Zeitschr. f. Immunf. Bd. 3. H. 7. p. 731.  
 Scott, Journ. of Path. and Bact. Vol. 15. p. 31.  
 Sleeswijk, Zeitschr. f. Immunf. Bd. 2. H. 2. p. 133.  
 Turan, Zeitschr. f. Immunf. 1909.  
 Wright, Studien über Immunisierung etc. Jena 1909.

*Nachdruck verboten.*

## Die Lungen bei der Anaphylaxie.

[Aus dem Laboratory of Pathology, University of Pennsylvania.]

Von Dr. H. T. Karsner, Philadelphia U. S. A.

Mit 6 Figuren.

Seit den Versuchen über Anaphylaxie von Richet, Arthus, v. Pirquet, Otto, Rosenau und Anderson u. a. ist es verschiedentlich unternommen worden, durch eine einzige Injektion gewisser Substanzen dieselbe Wirkung bei gesunden, nicht vorbehandelten Tieren hervorzubringen, wie sie die Reinjektion bestimmter Sensibilisinogene bei sensibilisierten Tieren hervorzurufen imstande ist. Von den Substanzen, welche benützt worden sind, um eine Vergiftung auszulösen, die man als Anaphylaxie hinstellt, sind besonders frisches Rinderserum und verschiedentliche hämotoxische Substanzen wie Ricin, Abrin, Solanin Hydrochlorat, Hirudin, ölsaures Natron zur Anwendung gekommen. Die Wirkung bei Anwendung der angeführten Substanzen gleicht bei oberflächlicher Betrachtung derjenigen, welche bei der echten Anaphylaxie zutage tritt. Es ist jedoch die Frage, ob eine biologische Gleichheit

vorliegt oder nicht. Zwecks genauerer Erforschung der Unterschiede zwischen echter Anaphylaxie und ähnlichen Zuständen wurden die nachstehenden anatomischen Untersuchungen vorgenommen.

Die pathologische Anatomie der Anaphylaxie wurde zuerst studiert von Gay und Southard<sup>1)</sup>. Diese Autoren weisen auf Gefäßerweiterung und Blutungen hin, die speziell in den Baueingeweiden zu sehen sind, und auf fettige Degenerationen, die in den Herzmuskelfasern sowie in den Nervenfasern nachzuweisen sind. Rosenau und Anderson<sup>2)</sup> schreiben die Gefäßerweiterung dem Shock zu und erklären, daß die makroskopischen Stauungen und Blutungen nicht häufig bei Meerschweinchen beobachtet wurden, welche durch eine Gehirninjektion mittels Pferdeserum vergiftet wurden. Diese Autoren waren außerstande, Gay und Southards Resulte mit Bezug auf die fettige Degeneration zu bestätigen. Erst Auer und Lewis<sup>3)</sup> haben die hauptsächlichsten charakteristischen Merkmale einer Anaphylaxie bei Meerschweinchen feststellen können. Sie geben an, daß die Lungen so erweitert sind, daß sie sich dicht an den inneren Brustkasten anschmiegen. Der Viscus ist blaß oder bläulich, leicht an Gewicht, schwimmt im Wasser und ist von schwammiger Konsistenz. Mitunter werden feine, punktartige Blutungen beobachtet. Die Luftröhre und die Bronchien sind trocken, aber zeigen öfters deutliche Stauung der Schleimhaut. Diese Angaben werden durch die Beobachtung von Biedl und Kraus und auch von mir bestätigt. Als unbedeutende Ausnahme fand ich jedoch, daß die Blutungen sehr selten vorkommen, und daß die Rötung der Luftröhre und Bronchien keineswegs konstanter Natur ist.

In meinen Untersuchungen bediente ich mich solcher Meerschweinchen, die ungefähr 250 g wogen. Die zweiten Einspritzungen von Pferdeserum und einzigen Einspritzungen anderer Substanzen wurden in die Vena jugularis gemacht. Die Gewebe waren in Zenkerscher Flüssigkeit fixiert und mit Hämatoxylin und Eosin, sowie mit Malloryscher Bindegewebefarbe gefärbt. (Diese letztere Farbe ist für Fibrin spezifisch.)

Es wurden folgende Versuche ausgeführt:

- |      |                 |   |
|------|-----------------|---|
| I.   | Experimente mit | anaphylaktischen Meerschweinchen (Pferdeserum). |
| II.  | „               | „ Peptoneinspritzungen.                         |
| III. | „               | „ toxischem Serum (Rinderserum).                |
| IV.  | „               | „ Immunsera                                     |
|      |                 | a) hämolytischer Ambozeptor,                    |
|      |                 | b) präzipitierender „                           |
| V.   | „               | „ hämotoxischen Substanzen                      |
|      |                 | a) Ricin,                                       |
|      |                 | b) Abrin,                                       |
|      |                 | c) Solanin hydrochlorat.,                       |
|      |                 | d) ölsaures Natron.                             |

I. In meinen Versuchen mit anaphylaktischen Meerschweinchen wurden dieselben durch subkutane Einspritzung eines Pferdeserums in Mengen von 0,05 ccm sensibilisiert. Die Reinjektion von 0,5, 1,0, 1,5, 3,0 ccm Pferdeserum wurde in die Vena jugularis gemacht. Die rasche tödliche Wirkung zeigte die gewöhnlichen Symptome der Anaphylaxie, d. h. mehr oder weniger allgemeine Krämpfe, Cyanose, Atmungsbe-

1) Journ. med. Research. Vol. 16. 1907. p. 143.

2) Arch. int. Med. Vol. 3. 1909. Juni.

3) Journ. exper. Med. Vol. 12. 1910. No. 2.

schwerden und schließliche Einstellung der Atmung, während der Herzschlag noch fort dauerte. Bei der Sektion wurde gefunden, daß das Herz in geringem Grade oder mitunter überhaupt nicht erweitert war. Blutgerinnungen wurden in dem geöffneten Herz nicht vorgefunden. Die Lungen waren im allgemeinen, makroskopisch betrachtet, in allen Fällen bedeutend ausgedehnt, blaß, leicht an Gewicht und von schwammiger Konsistenz; in keinem der Fälle waren bedeutende Blutungen oder besonders wahrnehmbare Stauung in den Bronchien zu finden. Histologisch erweisen sich die Bronchien als bedeutend verengt in sämtlichen Lungen, und zeigten deutliche Faltungen der Schleimhaut. Die Arterien waren gleichfalls stark verengt. Die großen Venen waren ein wenig erweitert und enthielten in einigen Fällen kleine Mengen konglutinierter Blutkörperchen. In einem Tiere waren die roten Körperchen von markanter Blässe. Einige der Kapillaren, welche nicht durch

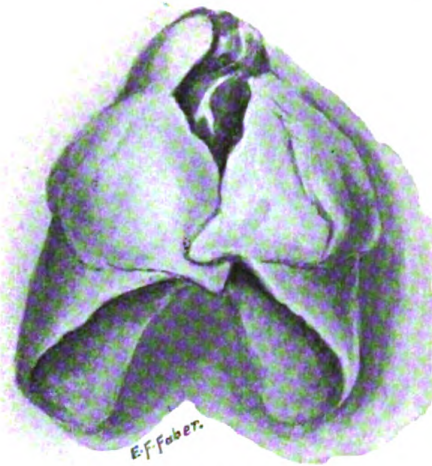


Fig. 1. Anaphylaxie.

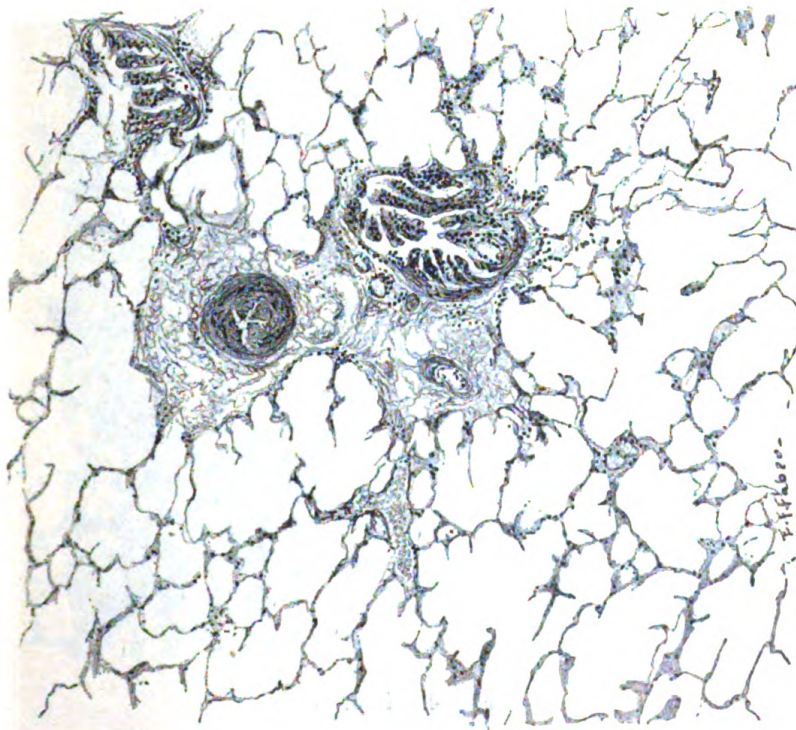


Fig. 2. Anaphylaxie.

die bedeutende Alveolarerweiterung entleert worden waren, enthielten mitunter konglutinierte Körperchen; dies war jedoch nicht häufig der Fall. Besonders hervorgehoben zu werden verdient ein mäßig peri-



vaskuläres Oedem in den perivaskulären Lymphräumen und in den losen Bindegeweben in der Nachbarschaft. Mittels der Malloryschen Bindegewebefärbung wurde konstatiert, daß die ödematöse Flüssigkeit geringe

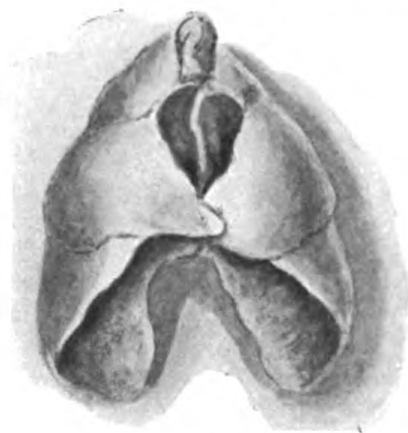


Fig. 3. Pepton.

Mengen von Fibrin enthielt. Die Alveolen erwiesen sich als erweitert, und häufig waren ihre Wände durchbrochen, so daß dieselben im Zusammenhang standen. Die Wände waren dünner als normal und die Lufträume leer, mit Ausnahme des Versuchsobjektes, welches 3,0 ccm Pferdeserum erhalten hatte. In einem Präparat dieses Tieres war ein kleiner Abschnitt wahrnehmbar, in welchem die Lufträume mit roten Blutkörperchen gefüllt waren, welches als eine mikroskopisch kleine Blutung zu betrachten ist. Die Alveolarräume zeigten das typische Bild eines vesikulären Emphysems.

II. Wittes Pepton, 10 Proz. in 0,85-proz. NaCl-Lösung, wurde bei gesunden Meerschweinchen in Mengen von 3,0 und 3,5 ccm injiziert. Es wurden die typischen Symptome der Anaphylaxie beobachtet. Die Lungen erweisen sich als bedeutend erweitert und gleichen den echten

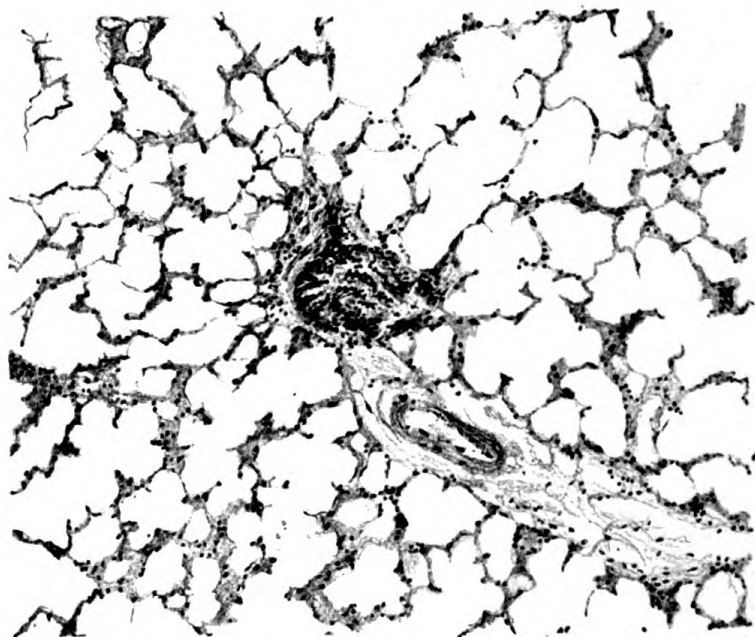


Fig. 4. Pepton.

anaphylaktischen Lungen sehr, ausgenommen, daß die kleinen makroskopischen Blutungen häufiger beobachtet wurden. Eine mäßige Herzerweiterung, frei von Blutgerinnsel, wurde konstatiert. Histologisch gleichen die Lungen gleichfalls denjenigen bei der Anaphylaxie, ausgenommen, daß die Bronchien und Arterien nicht so bedeutend verengt

waren. Das perivaskuläre Oedem war das gleiche, und die Beobachtung zeigte ferner denselben Grad von Konglutination der roten Blutkörperchen in Kapillaren sowohl als in Venen. Mikroskopische Blutungen waren nicht vorzufinden; deshalb muß angenommen werden, daß die Sektionsbefunde, welche anscheinend Blutungen vorwiesen, kleinen mikroskopischen Foci einer relativen Atelektase gleich waren, in welcher die Kapillaren durch Blut beträchtlich erweitert sind.

III. Drei Meerschweinchen wurden mit 0,5, 1,0, 2,0 ccm eines frischen Rinderserums injiziert. Der Tod trat schnell ein, und zwar mit typischen Symptomen der Anaphylaxie. Auf dem Sezirtische erwiesen sich die Lungen als kleine, enorm gestaute Organe mit häufigen punktförmigen Blutungen. Das Herz war stark erweitert und enthielt kleine Blutgerinnsel. Die Herzerweiterung wurde mehr auf der rechten wie auf der linken Seite konstatiert. Histologisch zeigten die Lungen mäßige Verengung der

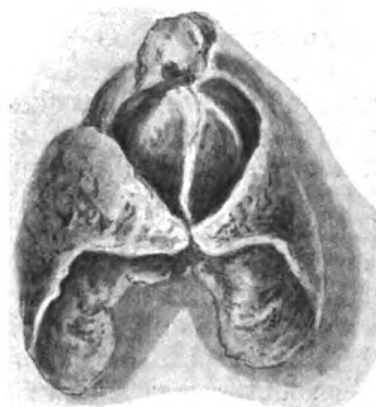


Fig. 5. Rinderserum.

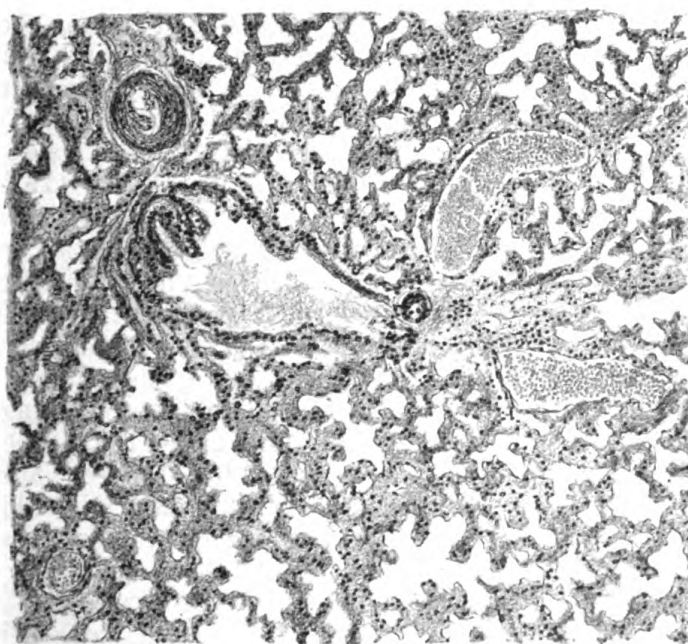


Fig. 6. Rinderserum.

Bronchien, während die Arterien nicht vom normalen Kaliber abwichen. Die Venen jedoch waren stark erweitert; ziemlich große Fibrinmengen und Fibrinfäden waren vorhanden. Ein perivaskuläres Oedem war in ungefähr gleichem Grade vorhanden wie in den anaphylaktischen Lungen.



Die Alveolarräume erwiesen sich hier und da erweitert und geborsten. größtenteils jedoch waren selbige von normaler Größe oder zusammengefallen und wiesen dicke, gestaute Wandungen auf und deutlich wahrnehmbare Kapillarverstopfung mit hyalin konglutinierten roten Blutkörperchen. Vielfach zeigten die Alveolarräume Oedem und Blutungen.

IV. Zwei Arten von Ambozeptoren wurden in dem Versuche benutzt, nämlich Serum eines gegen Schafblutkörperchen immunisierten Kaninchen (das 1:2400 verdünnte Serum löst 1 ccm 5-proz. Schafblutkörperchenaufschwemmung), und ferner ein Präzipitin eines gegen Pferdeserum immunisierten Kaninchens (das Serum erzeugte einen Niederschlag in einer Verdünnung von 1:1000000 Pferdeserum). Die intravenöse Einspritzung von 5,0 ccm eines solchen Präzipitins rief nur geringe Atmungsstörungen in den Meerschweinchen hervor mit nachheriger vollständiger Erholung. Die intravenöse Einspritzung von 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, ccm des hämolytischen Ambozeptors (1:2400 Titre) wirkte tödlich unter der Anaphylaxie gleichenden Symptomen. Hämolytische Ambozeptoren von geringerer Stärke (1:800 Titre) bewirkten keinen anderen Effekt als normales Kaninchenserum. Sämtliche Meerschweinchen, welche mit dem stärkeren Hämolsin injiziert waren, starben unter Symptomen der Anaphylaxie. Die Sektionen ließen die Lungen als mäßig erweitert erkennen und zeigten ferner bedeutende Blutstauung, nadelpunktgroße Blutungen und leicht erkenntliches Oedem. Das Herz war erweitert und mit dichten, schwarzen Gerinnungen gefüllt. Histologisch wiesen die Bronchien und Arterien nur sehr mäßige Verengung auf. Die Venen waren bedeutend erweitert und mit roten Blutkörperchen gefüllt sowie mit hyalinen Mengen von Serum und Fibrinfäden und zeigten mitunter Konglutination der Körperchen. Die Alveolarräume ließen in einigen wenigen Stellen Blutungen erkennen, aber der hauptsächlichste Faktor in den Präparaten war das außerordentlich starke Oedem in den Alveolarräumen.

V. Mit Bezug auf die hämotoxischen Substanzen sei erwähnt, daß die Wirkungen von Ricin und Abrin sich so völlig ähnelten, daß eine gemeinschaftliche Beschreibung angebracht erscheint. Das Ricin wurde in Dosen von 0,001, 0,002, 0,003, 0,010, 0,020 g gegeben, während das Abrin in Dosen von 0,001, 0,004, 0,010, 0,020 g angewandt wurde. Alle Tiere starben innerhalb 10—24 Stunden. Die Untersuchung zeigte, daß die Lungen mäßig gestaut waren; hier und da waren Stellen von Atelektasie nachweisbar. Es zeigten sich in den Lungen auch markante Stauung und zahlreiche punktförmige Blutungen. Die Pleura enthielt in einigen der Versuchsobjekte eine ziemlich große Menge einer klaren, wässerigen Flüssigkeit. Das Herz war erweitert und mit dunkelrotem Gerinnsel gefüllt. Histologisch erwiesen sich die Bronchien und Arterien in den Lungen mäßig verengt, während die Venen und viele Kapillaren erweitert waren. In allen Gefäßen ließ sich Konglutination der Körperchen nachweisen, welche in den Kapillaren die Verstopfung derselben hervorgebracht zu haben schienen. Bedeutendes perivaskuläres Oedem war vorhanden. Die Alveolarräume zeigten mäßige Erweiterung, Oedem und in einigen wenigen Stellen Blutungen.

Solanin-Hydrochlorat in Dosen von 0,002, 0,004, 0,005 g kam auch zur Anwendung. Ein tödlicher Erfolg trat schnell unter Symptomen

von Anaphylaxie ein. Die Lungen zeigen mäßige Erweiterung. Eine leichte Lungenstauung war nachweisbar. Das Herz schlug noch und enthielt feine Gerinnungen. Die histologische Untersuchung zeigte mäßige Verengerung der Arterien und Bronchien. Die Venen waren erweitert infolge der vorhandenen roten Blutkörperchen, des hyalinen Serums und Fibrins, und zeigten ebenfalls mäßige Konglutination. In den Kapillaren fanden sich verstopfende Massen konglutinierter Körperchen vor. Die perivaskulären Räume enthielten ein mäßiges Oedem, mitunter reich an Fibrin. Die Alveolen waren bedeutend erweitert. In den Alveolarräumen fand sich ein geringes Oedem vor, auch waren die Blutungen weniger bemerkbar.

Bei Anwendung des ölsauren Natrons in Dosen von 0,05, 0,1 und 0,2 g trat der Tod schnell ein unter Symptomen der Anaphylaxie. Lungenerweiterung, deutliche Stauung, zahlreiche punktförmige Blutungen und distinktes Oedem waren zu verzeichnen. Das Herz war sichtlich erweitert und mit Koagulis gefüllt. Nicht sehr ausgesprochene Verengerung der Bronchien und Arterien sowie deutliche Erweiterung der Venen und Kapillaren in den Lungen war histologisch nachzuweisen. Starke Konglutination der Körperchen in den größeren Venen und in den Kapillaren war vorhanden. Die perivaskulären Lymphräume waren mäßig ödematös. Die Alveolen waren bedeutend erweitert und zeigten deutlichen Durchbruch der Wandungen. Die Alveolarräume waren mit Oedem gefüllt in nahezu gleicher Quantität, wie in den mit hämolytischem Ambozeptor behandelten Lungen, und an verschiedenen Stellen hatten intra-alveolare Blutungen stattgefunden.

Es besteht darum eine große Aehnlichkeit zwischen dem anatomischen Befund der Lungen, Herz und Blut nach der Einspritzung von Ricin, Abrin, ölsaurem Natron und nach der Einspritzung von frischem toxischen Rinderserum, und es ist anzunehmen, daß die Wirkung des Rinderserums von ähnlicher Natur ist, wie die durch die hämotoxischen Substanzen hervorgebrachte.

Das Resultat der vorgenommenen Experimente scheint die folgenden Schlüsse zu rechtfertigen:

1) Daß das Lungenbild bei Pferdeserumanaphylaxie der Meerschweinchen vollkommen charakteristisch ist; die hauptsächlich nachweisbaren Befunde sind die Bronchialverengerung und markante Erweiterung und Durchbruch der Alveolen.

2) Daß das vorliegende, durch die verschiedenen Substanzen hervorbrachte Bild, welche künstliche Anaphylaxie hervorbringen sollen, absolut verschieden ist von demjenigen der echten Anaphylaxie, mit Ausnahme des Falles von Peptoneinspritzung, wo die Aehnlichkeit eine derartige ist, daß nur unwichtige Punkte zur Unterscheidung herangezogen werden können.

3) Daß die Wirkung auf die Lungen durch einen hämolytischen Ambozeptor hauptsächlich durch ein starkes Oedem charakterisiert ist; diejenige, welche mittels eines toxischen Rinderserums hervorgebracht ist, durch Blutungen, während diejenige, welche durch die erwähnten

hämotoxischen Substanzen hervorgebracht ist, sehr derjenigen des frischen Rinderserums ähnelt.

4) Daß Konglutination (Zusammenschmelzung) der roten Blutkörperchen in allen vorgenommenen Experimenten vorhanden, aber deutlicher nachweisbar ist in den nicht-anaphylaktischen, als wie in den wahren anaphylaktischen Zuständen.

*Nachdruck verboten.*

## Zur Frage der antiinfektiösen Wirkung des Diphtherieheilserums.

[Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institut in Wien  
(Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf).]

Von Dr. St. Bächer und Dr. M. Laub.

### I.

Im Gegensatz zu der allgemein verbreiteten Vorstellung, daß die Wirkung des Diphtherieheilserums eine ausschließlich antitoxische sei, haben klinische Erfahrungen und experimentelle Untersuchungen immer mehr zu der Auffassung geführt, daß dem Diphtherieheilserum noch eine andersartige Wirkung im Hinblick auf die Vernichtung der Diphtheriebacillen im Organismus zukomme.

Schon Bandi (1906) und später Menabuoni haben — der erstere im Diphtherieheilserum, der letztere im Serum von behandelten diphtheriekranken Kindern — eine phagocytosebefördernde (opsonisierende) Wirkung nachgewiesen und die Schutzwirkung zum Teil hierauf zurückgeführt.

In seinen experimentellen Studien über Phagocytose hat dann Sauerbeck auch das Diphtherieheilserum nach dieser Richtung untersucht und festgestellt, daß es zwar für sich allein ohne Einfluß auf die Phagocytose der Diphtheriebacillen ist, zusammen mit aktivem Normalserum aber die Phagocytose beträchtlich steigert; andererseits glaubte er einen hemmenden Einfluß des Diphtherietoxins auf die Phagocytose beobachten zu können. Da aber die phagocytosebefördernde Wirkung des Serums sich gerade bei atoxischen Stämmen deutlich gezeigt hat, folgerte Sauerbeck, daß im „Antitoxin“ (antitoxischen Serum) noch ein anderer Antikörper vorhanden sein müsse, der die Phagocytose erleichtere. Diesen Antikörper vermutete er im lytischen Ambozeptor, weil er einerseits Bakterientropine und Opsonine ausschließen zu können glaubte, andererseits die Herabsetzung der Phagocytose, die bei einzelnen Stämmen bei reichlichem Zusatz von Diphtherieheilserum beobachtet wurde, auf einer Verminderung der Bakterienzahl (Bakteriolyse?) zu beruhen schien.

Ohkubo konnte bei der Nachprüfung dieser Versuche die phagocytosebefördernde Wirkung des aktiven Diphtherieheilserums, bezw. des inaktivierten bei Zusatz frischen Meerschweinchenserums bestätigen, stellte aber die im Prinzip gleichen Fähigkeiten beim normalen Pferdeserum fest. Die opsonisierende Wirkung kommt also nach ihm durch das

Zusammenwirken eines thermostabilen und thermolabilen Körpers zustande, von denen der erstere ganz wie der bakteriolytische Ambozeptor durch die Bakterien absorbiert wird (Präparin). Dagegen muß Ohkubo die von Sauerbeck behauptete Identität dieses Körpers mit dem lytischen Ambozeptor dahingestellt sein lassen, da den Gemischen von Antiserum und aktivem Normalserum jede Spur einer lytischen Wirkung auf die Diphtheriebacillen abgeht. Ferner konnte er im Gegensatz zu Sauerbeck einen hemmenden Einfluß des Diphtherietoxins auf die Phagocytose nicht beobachten; er führt vielmehr diese Wirkung auf den Zusatz von Karbolsäure zurück.

Endlich hat Ohkubo festgestellt, daß die von den Leukocyten in vitro sehr rasch aufgenommenen Diphtheriebacillen anfangs in großer Menge vernichtet werden, von der zweiten Stunde angefangen wohl infolge der Erschöpfung der Vitalität der Phagocyten eine intracelluläre Vermehrung der Bacillen beginnt.

Auch Lindemann gelangt neuestens zu dem Resultate, daß dem Diphtherieheilserum weder an sich noch in Verbindung mit Komplement eine bakterizide Wirkung, dagegen eine gegenüber dem Normalserum verstärkte Beförderung der Phagocytose zukommt. Da diese nicht bloß im aktiven oder durch Zusatz von Meerschweinchenserum komplettierten Antiserum, sondern auch zuweilen im inaktivierten Diphtherieserum zu beobachten war, so nimmt Lindemann an, daß das Diphtherieimmunserum außer Immunopsoninen auch Bakteriotropine enthält, und glaubt, daß die phagocytären Antistoffe für die antiinfektiöse Wirkung des Diphtherieheilserums in Betracht kommen könnten.

## II.

Auch unsere Untersuchungen, die in ihren Anfängen vor das Erscheinen der genannten Arbeiten der letzten drei Autoren zurückgehen, zielten zunächst auf die Feststellung einer bakteriziden Wirkung des Diphtherieheilserums hin. Wir haben zu diesem Zwecke eine größere Anzahl von Diphtherieheilseren in verschiedenen Versuchsanordnungen sowohl im Tierkörper als auch in vitro auf ihre bakterizide Wirkung untersucht.

Was zunächst unsere Versuche in vivo anlangt, haben wir uns in der Methodik an die von Kraus und Bächer und an die von uns in unseren Studien über die Wirkungsweise des Dysenterieserums geübte Technik gehalten. Es wurde festgestellt, ob eine bestimmte Dose Serum, gleichzeitig oder präventiv injiziert, das Tier gegen eine intraperitoneale Infektion mit einer bestimmten Keimmenge zu schützen und gleichzeitig eine Verminderung bzw. Schwinden der Keime herbeizuführen imstande ist. Unsere in dieser Richtung angestellten Versuche, von denen wir ein Beispiel in Tab. I mitteilen, zeigten, wenn auch nicht immer gleichmäßige, so doch überwiegend positive Resultate.

In dem angeführten Versuche schützt 0,1 und 0,01 vom Diphtherieserum Kibitz gegen die Infektion mit 1,0 ccm Diphtheriebacillenaufschwemmung und bewirkt in den nach ca. 6 Stunden entnommenen Proben deutliche Keimverminderung. Gegen eine doppelt so große Infektionsdosis wirkt Serum Kibitz nur in der Menge 0,1, allerdings kommt auch das Tier, das 0,1 vom Kontrollserum Laura erhalten hat, mit dem Leben davon, doch tritt hierbei keine Keimverminderung ein.

Tabelle

Peritoneal

18. Dez. 1909.

48-stündige Agarkulturen von St. Aaser 1907 in 5 ccm Bouillon aufgeschwemmt,  
Nach den angegebenen Zeiten je 2 Tropfen Peritonealexsudat in Agar von 43° verteilt  
Kol: Kolonienzahl nach 24 Stunden auf den Agarplatten, L: Leukocytenmenge,

Di- phtherie	Bouillonserum		Meer- schweinchen (resp. Ausg.)	Entnahme nach 1½, Stunden			
				Kol	L	Ph	B
1,0	1,0	Bouillon	497 (+ 19)	∞	wenig	gering	zahlreich
1,0	0,1	Laura (Norm.-S.)	765 (+ 19)	∞	zahlreich	„	wenig
1,0	0,01	„ „	384 (+ 19)	∞			
1,0	0,001	„ „	757 (+ 19)	∞			
1,0	0,1	Kibitz (Diphth.-S.)	796 (lebt)	∞	„	„	„
1,0	0,01	„ „	453 (lebt)	∞			
1,0	0,001	„ „	481 (+ 20)	∞			
2,0	1,0	Bouillon	763 (+ 19)	∞	wenig	mäßig	∞
2,0	0,1	Laura (Norm.-S.)	599 (+ 19)	∞	zahlreich	„	∞
2,0	0,01	„ „	424 (lebt)	∞			
2,0	0,001	„ „	353 (+ 19)	∞			
2,0	0,1	Kibitz (Diphth.-S.)	760 (lebt)	∞	zahlreich	stark	zahlreich
2,0	0,01	„ „	793 (+ 20)	∞			
2,0	0,001	„ „	752 (+ 19)	∞			

Weiterhin ergaben die Versuche, daß bei Anwendung genügend großer Infektionsdosen die Keimverminderung nur vorübergehend ist, und die Schutzwirkung nur in einer Verlängerung der Lebensdauer besteht (Tab. II).

Dieser Versuch zeigt auch, daß das mit Bakterien gewonnene Serum Günther weder in seiner bakteriziden noch in seiner Schutzwirkung den antitoxischen Seren überlegen ist. Die bei diesen und

Tabelle

Peritoneal

3. Febr. 1911.

Meerschweinchen intraperitoneal Gemisch von je 2,0 Bakterienaufschwemmung Bouillon ad 2,5 ccm. Nach den angegebenen Zeiten je 2 gtt Peritonealexsudat in Agar Sera: Laura (Typhusser.), Janus (Tetanusheils.), Günther (antibakt. Diphtherieser.), Kol: Kolonienzahl auf den Platten nach 24 Std.; L: Leukocytenmenge; Ph:

Di- phtherie	Serum resp. Bouillon	Meer- schwein- chen	Ausgang	Entnahme nach 1 Std.				Entnahme nach 2 Std.			
				Kol	L	Ph	B	Kol	L	Ph	B
2,0	Bouillon	971	† 4. II.	∞	wenig	gering	∞	∞	zahlr.	stark	∞
2,0	0,1 Laura	937	† 4. II.	∞	„	„	∞	∞	„	„	∞
2,0	0,1 Janus	954	† 4. II.	∞	„	„	∞	∞	„	„	zahlr.
2,0	0,01 Günther	989	† 4. II.	∞	„	stark	∞	∞	wenig	„	∞
2,0	0,05 „	982	† 5. II.	∞	„	„	∞	∞	sehr zahlr.	„	wenig
2,0	0,1 „	953	† 5. II.	∞	„	„	∞	∞	„	„	„
2,0	0,01 Magda	384	† 4. II.	∞	„	gering	∞	∞	„	„	„
2,0	0,05 „	838	† 6. II.	∞	„	stark	∞	∞	zahlr.	„	„
2,0	0,01 Loki	906	† 4. II.	∞	„	„	∞	∞	„	„	zahlr.
2,0	0,05 „	965	† 6. II.	∞	„	mäßig	„	∞	„	„	wenig

## I.

versuch.

davon Meerschweinchen intraperitoneal. Gemische mit Serum (resp. Bouillon ad 1,0 ccm). und Platten gegossen; gleichzeitig Ausstriche auf Objektträger.

Ph: Intensität der Phagocytose, B: Menge der freien Bakterien.

Entnahme nach 6 Stunden				Entnahme nach 24 Stunden			
Kol	L	Ph	B	Kol	L	Ph	B
zahlreich	∞	gering	wenig	zahlreich	∞	gering	wenig
"	∞	"	"	spärlich	zahlreich	θ	θ
"				zahlreich			
wenig	"	"	θ	einzeln	∞	θ	θ
"				"			
"				"			
zahlreich	sehr zahlr.	mäßig	wenig	zahlreich	zahlreich	gering	wenig
∞	"	"	"	"	"	"	"
∞				∞			
∞				(+)			
spärlich	∞	stark	"	spärlich	∞	"	θ
zahlreich				einzeln			
"				zahlreich			

anderen Versuchen angefertigten und gefärbten Ausstriche überzeugten uns, daß die Keimverminderung mit einem vermehrten Auftreten von Leukocyten und verstärkter Phagocytose parallel geht.

Auch bei präventiver Injektion zeigte sich die überlegene Wirkung des Diphtherieheilserums gegenüber dem normalen Pferdeserum (Tab. III), insbesondere hinsichtlich der Keimverminderung. Allerdings schützte auch 0,1 eines normalen Pferdeserums bei präventiver Anwendung (der

## II.

versuch.

(5,0 ccm Bouillon auf 48-stünd. Agarkultur von Diphtherie Aaser 1907) + Serum resp. von 43° verteilt und Platten gegossen, gleichzeitig Ausstrich auf Objektträger.

Magda (150-faches Diphtherieheiser.), Loki (600-faches Diphtherieheiser.).

Intensität der Phagocytose; B: Menge der freien Bakterien (in den Ausstrichen).

Entnahme nach 4 Std.				Entnahme nach 7 Std.				Entnahme nach 10 Std.			
Kol	L	Ph	B	Kol	L	Ph	B	Kol	L	Ph	B
∞	sehr zahlr.	sehr stark	zahlr.	∞	sehr zahlr.	sehr stark	wenig	zahlr.	sehr zahlr.	stark	wenig
∞	∞	stark	"	zahlr.	∞	gering	"	wenig	∞	"	"
∞	∞	"	"	∞	∞	stark	"	"	∞	gering	"
∞	∞	"	"	∞	∞	"	"	"	∞	"	"
wenig	∞	gering	wenig	wenig	∞	gering	θ	wenig	∞	θ	θ
"	∞	"	"	zahlr.	∞	"	wenig	∞	∞	stark	wenig
zahlr.	∞	"	"	wenig	∞	"	"	∞	∞	gering	"
∞	∞	sehr stark	zahlr.	∞	∞	stark	"	zahlr.	∞	"	θ
sehr zahlr.	∞	stark	"	∞	∞	"	"	∞	∞	stark	wenig
zahlr.	∞	gering	θ	wenig	∞	"	θ	wenig	∞	gering	θ

Erste Abt. Orig. Bd. 61.

Heft 3.

17



letale Ausgang bei Meerschweinchen 855 schon nach 6 Stunden trotz Immunserum war auf eine innere Verletzung zurückzuführen).

Tabelle III.

13. Febr. 1910.

## Peritonealversuch nach Präventivbehandlung.

24 Stunden nach intraperitonealer Injektion von Serum (resp. Bouillon ad 1,0 ccm) werden jedem Meerschweinchen 1,5 ccm Diphtherieaufschwemmung (5,0 ccm Bouillon auf 48-stünd. Agarkultur von St. Aaser 1907) intraperitoneal injiziert. Nach den angegebenen Zeiten werden je 2 gtt Peritonealexsudat in Agar von 43° verteilt und Platten gegossen, gleichzeitig (bei der 1. Entnahme) Ausstriche auf Objektträger.

Sera: Laura (Typhusser.), Lorenz (Meningokokkenser.), Günther (antibakt. Diphtherieser.), Magda (150-faches Diphtherieheils.), Loki (600-faches Diphtherieheils.).

Präventiv	Meerschweinchen	Diphtherie	Ausgang	Entnahme nach 2 Std.				E. n. 6 Std.	E. n. 9 Std.	E. n. 24 Std.
				Kol	L	Ph	B	Kol	Kol	Kol.
1,0 Bouillon	947	1,5	† 15	∞	sehr zahlr.	stark	wenig	wenig	wenig	—
0,1 Laura	941	1,5	lebt	∞	„	sehr stark	„	zahlr.	sehr zahlr.	wenig
0,1 Lorenz	929	1,5	† 15	∞	„	„	„	„	zahlr.	wenig
0,01 Günther	867	1,5	lebt	sehr zahlr.	„	stark	θ	„	„	(kein Exsud.)
0,05 „	954	1,5	„	zahlr.	„	„	θ	„	wenig	„
0,1 „	838	1,5	„	„	„	gering	θ	wenig	„	„
0,01 Magda	891	1,5	„	„	zahlr.	stark	wenig	„	„	„
0,05 „	855	1,5	† nach 6 Std.	sehr zahlr.	∞	„	θ	zahlr.	—	—
0,1 „	946	1,5	lebt	„	∞	„	wenig	„	zahlr.	(kein Exsud.)
0,01 Loki	684	1,5	„	„	sehr zahlr.	sehr stark	„	„	„	„
0,05 „	925	1,5	„	zahlr.	∞	stark	θ	wenig	wenig	„
0,1 „	939	1,5	„	„	∞	gering	θ	zahlr.	zahlr.	„

Es war nun von Interesse, die in vivo festgestellte bakterizide Wirkung auch in vitro zu untersuchen. Es sei gleich bemerkt, daß unsere diesbezüglichen Versuche, die aus anderen Gründen nach langer Zwischenzeit mit anderen Seren und einem anderen Diphtheriestamme unternommen wurden, ein negatives Resultat ergeben haben.

Weder hochwertige antitoxische Sera (Darling war 1300-fach) noch Sera, denen, wie die späteren Versuche zeigen werden, phagocytosebefördernde Wirkung zukommt, vermochte weder an sich noch in Verbindung mit frischem Meerschweinchenserum (Komplement) noch in Verbindung mit Leukocyten eine nachweisbare Keimverminderung hervorzubringen.

Eine Erklärung der scheinbar widersprechenden Resultate in den Versuchen in vivo und in vitro bietet uns die mit Ohkubos Beobachtungen übereinstimmende Annahme, daß in vitro die Vitalität der Leukocyten infolge äußerer Einflüsse alsbald so weit geschädigt ist, daß nur Phagocytose, nicht aber Vernichtung größerer Keimmengen eintreten kann.

Jedenfalls ergibt sich aus diesen Versuchen in Uebereinstimmung

mit Ohkubo, Lindemann und anderen Autoren, daß im Diphtherieheilserum keine bakteriziden Ambozeptoren vorhanden sind.

Tabelle IV.

1. April 1911.

**Bakterizider Versuch in vitro (Pferdeserum).**

1,0 Bakterienaufschwemmung + Leukocyten, resp. Serum, Komplement und phys. Lösung ad 2,0, 1 Stunde bei 37°, dann 2 Oesen Aussaat in Agar bei 45°.

Bakterienaufschwemmung: 50-fache Verdünnung der Stamm- aufschwemmung (5 ccm phys. Lösung auf eine 24-stündige Agarkultur vom Stamm Amerika).

Pferdesera:

17 (450-fach)	v. Dez. 1910	Oktob. (12. Jan. 11 Meningok.-Ser.)	} Kontrollsera
19 (160- " )		Olymp (24. Nov. 10 Paratyph.-Ser.)	
22 (160- " )		Ozean (24. Nov. 10 Typh.-Ser.)	
23 (150- " )		} Diphth.-Heilsera	
41 (500- " )			
51 (600- " )			
Darling (karbol. alt 1300-f.)			

Komplement: frisches normales Meerschweinchenserum.

Leukocyten: aus dem Peritonealexsudat von Meerschweinchen (nach Bouillon-Kochsalzinjektion steril in phys. Citratlösung aa aufgefangen).

a) unverändert,

b) nach 3maliger Waschung in phys. Lösung, in ursprünglicher Dichte in phys.

Lösung aufgeschwemmt.

Sterilitätskontrollen: Kompl.: steril, Leukocyten a): wenig, b): steril.

1,0 Bakt. + 0,1 Ser.	17	19	22	23	41	51	Darling	Oktob.	Olymp	Ozean
+ phys. Lösg.	sehr zahlr.	sehr zahlr.	sehr zahlr.	sehr zahlr.	sehr zahlr.	sehr zahlr.	sehr zahlr.	sehr zahlr.	sehr zahlr.	sehr zahlr.
+ 0,1 Kompl.	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
+ 1,0 Leukocyt. a)	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
+ 1,0 Leukocyt. b)	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"

1,0 Bakt. + 0 Ser. + phys. Lösg.: vereinzelt

1,0 " + 0 " + 0,1 Kompl.: mehrere

1,0 " + 0 " + 1,0 Leuk. a): sehr zahlreich

1,0 " + 0 " + 1,0 " b): " "

Trotz der negativen Ergebnisse der Versuche in vitro haben wir gleich den anderen oben genannten Autoren geglaubt, zunächst an der Annahme festhalten zu müssen, daß der Phagocytose eine wesentliche Rolle bei der Vernichtung der Diphtheriebacillen zukomme, und wir haben daher die Fähigkeit des Diphtherieheilserums, die Intensität der Phagocytose zu beeinflussen, einer eingehenden Untersuchung unterzogen.

In der Technik hielten wir uns im wesentlichen an die von Neufeld und seinen Schülern bei ihren bakteriotropen Versuchen angewendete Methodik mit den durch die speziellen Untersuchungsziele gebotenen Aenderungen. Wir haben dementsprechend im allgemeinen davon abgesehen, eine phagozytäre Zahl als Maßstab der Phagocytose festzustellen, da unsere eigenen Erfahrungen (Bächer und Laub „Ueber Opsonine und ihre Bedeutung für die Tuberkulinbehandlung“) wie die anderer Autoren und auch Sauerbecks den nur relativen Wert solcher Zahlenangaben erwiesen hatten. Soweit uns zahlenmäßige Feststellungen erforderlich erschienen, haben wir uns begnügt, die Prozentzahl der phagocytierenden Leukocyten zu bestimmen. Ueberzeugend schienen uns auch diese nur insoweit, als sie mit unserem allgemeinen Eindruck übereinstimmten.

Im allgemeinen gestaltete sich die Technik folgendermaßen: 0,2 ccm einer Bakterienaufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung wurde mit Serum resp. einem Gemisch von Serum und Komplement und physiologischer Kochsalzlösung in der Gesamtmenge von 0,2 versetzt und 0,2 einer dichten Leukocytenemulsion zugefügt. Die Bakterienaufschwemmungen wurden durch Verreiben einer 24-stündigen Agarkultur zumeist des Stammes Amerika, der zugleich hochtoxisch und stark infektiös ist, in 3—5 ccm physiologischer Kochsalzlösung gewonnen und nach einstündiger Erhitzung bei 70° und Absetzen, bzw. Abzentrifugieren der groben Klumpen verwendet. Die Leukocyten stammten in der Regel aus dem Peritonealexsudat vom Meerschweinchen, das 6 Stunden nach der Injektion eines Bouillon-Kochsalzgemisches in reichlicher Menge mit der Kapillarpipette entnommen wurde. Sie wurden in dem von Sauerbeck angegebenen physiologischen Citrat-Kochsalzgemisch (1 Proz. Natr. citr. + 0,63 Proz. Kochsalz) aufgefangen und nach dreimaligem Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung in dieser aufgeschwemmt zum Versuche verwendet.

Die Gemische blieben in sterilen Eproutetten eine Stunde bei 37°, dann wurde von dem inzwischen abgesetzten Sedimente mit Kapillaren abpipettiert und Ausstriche angefertigt. Als Färbung bewährte sich uns am besten nach Fixation in Methylalkohol fünffach verdünnte Lösung von Giemsa-Azur II mit Aq. dest. durch 2 Minuten, reichliches Abspülen mit destilliertem Wasser.

In einem Vorversuche wurde normales Meerschweinchenserum auf seine opsonisierende Fähigkeit untersucht.

Tabelle V.

15. Dez. 1909.

Opsoninversuch.

0,2 Bakterienaufschwemmung + 0,2 Serum (verdünnt) + 0,2 Leukocyten,  $\frac{1}{5}$  Stunde in Röhrchen bei 37°, Ausstriche aus dem Sediment, Färbung nach Leishman.

Bakterienaufschwemmung: 24-stünd. Agarkulturen der Diphtheriestämme Amerika, Kopenhagen und MacFarlan in 5 ccm phys. Lösung fein verteilt.

Sera: 1) frisches Meerschweinchenserum 1:4 mit phys. Lösung verdünnt (0,2:0,04 Serum),

2) normales,  $\frac{1}{5}$  Stunde bei 60° inaktiviertes Pferdeserum, 1:4 verdünnt. Leukocyten vom Meerschweinchen aus Peritonealexsudat.

Prozentzahl der phagocytierenden Leukocyten:	Amerika	Kopenhagen	Mac Farlan
0,2 phys. Lösung	12 Proz.	10 Proz.	36 Proz.
0,04 akt. Meersch.-Ser.	26 "	52 "	62 "
0,04 inakt. Norm.-Pf.-Ser.	14 "	12 "	32 "

Es zeigt sich, daß noch 0,04 (0,2 einer 5-fachen Verdünnung) normalen Meerschweinchensersums auf alle drei untersuchten hochtoxischen Diphtheriestämme eine deutliche phagocytosebefördernde Wirkung besitzt, nicht aber inaktiviertes normales Pferdeserum. Andere in gleicher Anordnung vorgenommene Versuche beweisen, daß diese Wirkung nur dem frischen aktiven, nicht jedoch dem inaktivierten Serum zukommt. Des weiteren ergab sich aber, daß zwar 0,01 des aktiven Meerschweinchensersums nicht imstande war, die Phagocytose zu beeinflussen, wohl aber sowohl ein antitoxisches Diphtherieserum als auch ein normales Pferdeserum, die beide inaktiviert und an sich unwirksam waren, derart komplettieren konnte, daß starke Phagocytosebeförderung zustande kam.

Tabelle VI.

29. Dez. 1909.

Opsoninversuch.

Anordnung wie in Tabelle V.

Ausstriche nach 1 Stunde bei 37°, Färbung nach Manson.

Bakterienaufschwemmung: 24-stünd. Agarkultur von St. Kopenhagen in 5,0 ccm phys. Lösung.

Sera: 1) Ode (500-faches Diphtherieheilserum) } inaktiviert,  
2) Olive (normales Pferdeserum) }  
3) frisches Meerschweinchenserum (Komplement).

Leukocyten vom Meerschweinchen.

Prozentzahl der phagocytierenden Leukocyten bei Zusatz von Serum resp. phys.

Lösung ad 0,2 ccm:

1) 0,2 phys. Lösung	43 Proz.	6) 0,01 Komplement	54 Proz.
2) 0,1 Olive	45 "	7) 0,05 Olive + 0,01 Kompl.	90 "
3) 0,1 Ode	47 "	8) 0,05 Ode + 0,01 "	88 "
4) 0,05 Komplement	96 "	9) 0,005 " + 0,01 "	92 "
5) 0,02 "	73 "		

Wir haben daraufhin eine große Zahl von Immun- und Normalpferdeseren, resp. Seren von Pferden, die mit anderen Antigenen als Diphtherie behandelt wurden, auf ihre opsonische Fähigkeit bei Komplettierung mit an sich unwirksamen Mengen von Meerschweinchenserum (0,01 oder 0,005) untersucht und konnten in den weitaus überwiegenden Fällen bei beiden Gruppen diese Fähigkeit feststellen. 0,05 Serum, in manchen Fällen auch 0,02, zeigte ohne Rücksicht, ob es sich um ein Immun- oder Normalserum handelte, bei Zusatz von Komplement deutliche opsonische Wirkung; in vereinzelt Fällen, und zwar auch bei Immunseren, blieb diese Wirkung bei den angegebenen Dosen aus. Gelegentlich zeigten sich allerdings Immunsera auch in Dosen von 0,005 wirksam, es scheint diesen demnach immerhin eine quantitativ stärkere Wirksamkeit eigen zu sein.

Bei einem Vergleich der festgestellten antitoxischen und opsonischen Fähigkeit der Immunsera konnte aber kein Parallelismus dieser Eigenschaften festgestellt werden, wie auch der in Tab. VII mitgeteilte Versuch ergibt.

Tabelle VII.

10. Dez. 1910.

Opsoninversuch.

Anordnung wie in Tabelle V (Serum + Komplement + physiol. Lösung ad 0,2).

Ausstriche nach  $\frac{1}{2}$  Stunde bei 37°.

Bakterienaufschwemmung: 2 Agarkulturen von St. Amerika (24-stünd.) in 5 ccm physiol. Lösung (abgetötet).

Sera: a) Diphtherieheilsersa ( $\frac{1}{2}$ -prom. Karbolzusatz)

753 (400-fach)

856 (400- " )

768 (160- " )

968 (160- " )

Günther (antibakteriell)

Darling (1300-fach, alt)

b) Komplement: frisches normales Meerschweinchenserum.

Leukocyten vom Meerschweinchen.

Kontrollen: 0,2 physiol. Lösung 8 Proz.

0,05 Komplement 20 "

0,005 " 11 "

0,002 Darling 18 "

Diphtherieserum:	753	856	768	968	Günther	Darling
0,02 Serum (allein)	10 Proz.	12 Proz.	13 Proz.	13 Proz.	15 Proz.	21 Proz.
0,02 Ser. + 0,005 Kompl.	16 "	15 "	15 "	23 "	15 "	49 "
0,002 Ser. + 0,005 Kompl.	14 "	9 "	13 "	20 "	14 "	27 "

In diesem Versuche ist das 160-fache Immunserum 968 in 100-facher Verdünnung komplettiert noch wirksam, das 400-fache Serum 856 in derselben Konzentration aber nicht.

Aehnliche Beobachtungen ergaben unsere sonstigen Versuche, insbesondere die in Tab. IX mitgeteilten.

Das antibakterielle Diphtherieserum Günther hat sich in diesen Versuchen ebensowenig wie früher in den bakteriziden Versuchen von den antitoxischen besonders unterschieden; allerdings war auch sein agglutinierender Titre nicht höher als 1:300.

Von besonderem Interesse namentlich im Hinblick auf den praktischen Wert der opsonischen Eigenschaft der Sera erschien uns die Frage, ob sie auch durch das normale Menschen Serum, und zwar für menschliche Leukocyten komplettiert würden. Wir haben in diesem Versuche ausnahmsweise die Wrightsche Technik genau nach den bekannten Vorschriften angewendet. Hier zeigt sich auch auf Grund des phagocytischen Index, daß normales Menschen Serum sich in ganz gleicher Weise verhält, wie normales Meerschweinchen Serum: in genügender Konzentration wirkt es phagocytosebefördernd, in stärkerer Verdünnung an sich unwirksam, vermag es die Opsonine des Pferdeserums zu komplettieren. Auch in diesem Versuch enthält das normale Serum nicht minder opsonische Ambozeptoren als das Immunserum.

Tabelle VIII.

27. Juni 1910.

Opsoninversuch.

Wrightsche Technik. Färbung nach Leishman.

Diphtherieheilserum 768 (150-fach) ex 1908.

Kontrolle: Pferdeserum Olive. Dez. 1909.

Normales frisches Menschen-Serum und Menschen-Leukocyten.

Bakterienaufschwemmung: 5,0 ccm physiol. Lösung auf eine 24-stünd. Agarkultur von Diphth. Mac Farlan, 5 Min. bei geringer Geschwindigkeit zentrifugiert.

1 Teil Leukocyten + 1 Teil Bakterienaufschwemmung +	phagoc. Index	Phagoc. Proz.
1. Kontrolle (2 Teile physiol. Lösung)	0,25	12
2. 1 Teil norm. Menschen Serum + 1 Teil physiol. Lösung	0,9	24
3. 1 Teil $\frac{1}{10}$ norm. Menschen Serum + 1 Teil physiol. Lösung	0,39	13
4. 1 Teil $\frac{1}{10}$ Diphtherieserum + 1 Teil physiol. Lösung	0,21	7
5. 1 Teil $\frac{1}{10}$ " + 1 Teil $\frac{1}{10}$ norm. Menschen Serum	0,9	23
6. 1 Teil $\frac{1}{10}$ Kontroll-Pferdeserum + 1 Teil physiol. Lösung	0,31	8
7. 1 Teil $\frac{1}{10}$ " " + 1 Teil $\frac{1}{10}$ norm. Menschen Serum	1,2	25

Ueberblicken wir unsere bisherigen Phagocytosestudien, so kommen wir in Uebereinstimmung mit Ohkubo zu dem Ergebnis, daß das Pferdeserum komplex gebaute, durch Komplement (frisches Meerschweinchen- oder Menschen Serum) aktivierbare Körper (Opsonine) enthält, die auf Diphtheriebacillen hochtoxischer Stämme phagocytosebefördernd wirken. Diese Wirkung kommt prinzipiell in gleicher Weise dem Normal- als auch dem Diphtherieheilserum zu; vielleicht bestehen hier quantitative Unterschiede zugunsten des letzteren; sicherlich haben diese keinen Zusammenhang mit der antitoxischen Wertigkeit der Sera.

Aus den mitgeteilten Versuchen hat sich auch ergeben, daß die inaktivierten Sera ohne Zusatz von Komplement in der Regel keinerlei

Einfluß auf die Phagocytose ausübten, daß sie also keine thermostabilen, an sich wirksamen Substanzen (Bakteriotropine) enthalten. Indessen haben wir unter der großen Zahl der untersuchten Sera doch einzelne gefunden, die inaktiviert — auch ohne Zusatz von Komplement — immerhin aber schwächer als bei Komplementzusatz — phagocytosebefördernd waren. Bemerkenswerterweise waren darunter auch Normalpferdesera, so daß auch nach dieser Richtung prinzipiell kein Unterschied zwischen Immun- und Normalseren — höchstens quantitativ — zu bestehen scheint.

Es erscheint daher die Annahme Lindemanns, daß die gelegentlich im Diphtherieheilserum enthaltenen thermostabilen wirksamen Körper als echte Immunkörper (Bakteriotropine) anzusprechen sind, zumindest zweifelhaft, es handelt sich vielmehr um mitunter dem normalen Pferdeserum zukommende Fähigkeiten (Normal-Bakteriotropine?).

Tabelle IX.

13. Jan. 1911. Opsoninversuch.

Anordnung wie in Tabelle V (Serum + Komplement + physiol. Lösung ad 0,2). Ausstriche nach 1 Stunde bei 37°.

Bakterienaufschwemmung: 24-stünd. Agarkultur von St. Amerika in 5,0 ccm physiol. Lösung (abgetötet).

Sera: a) Diphtherieheilsera vom Pferd (inaktiv,  $\frac{1}{2}$ -prom. Karbolzusatz)

19 (160-fach)

23 (150- „ )

22 (160- „ )

17 (450- „ )

41 (500- „ )

51 (600- „ )

b) Kontrollsera von Pferden, die mit anderen Antigenen als Diphtherie vorbe-handelt sind (inaktiv,  $\frac{1}{2}$ -prom. Karbolzusatz).

Ozean (Typhus), Olymp (Paratyphus), Oktober (Meningokokken), Onkel (Dysen-terie), Orion (Meningokokken).

Komplement: frisches Meerschweinchenserum.

Leukocyten vom Meerschweinchen.

Kontrollen: 0,2 physiol. Lösung (ohne Karbol) 14 Proz.

0,2 „ „ + 0,00001 Karbol 15 „ <sup>1)</sup>

0,05 Komplement + 0,00001 „ 16 „

0,005 „ + 0,00001 „ 11 „

0,02 Serum	19	23	22	17	41	51	Ozean	Olymp	Oktober	Onkel	Orion
ohne Kompl.	12%	24%	16%	11%	30%	32%	14%	35%	29%	15%	12%
+ 0,005 Kompl.	28 „	26 „	33 „	35 „	33 „	43 „	39 „	41 „	36 „	36 „	30 „

Da sich in fast allen bisherigen Versuchen die Bedeutung des Komplementes für das Zustandekommen der phagocytosebefördernden Wirkung des Pferdeserums (in gleicher Weise für Immun- und Normalserum) gezeigt hatte, so war es naheliegend, eine Bestätigung dieser Befunde resp. eine Differenzierung der Fähigkeiten des Immun- und Normalserums durch die klassische Methode der Komplementbindung zu versuchen. Unsere mit zahlreichen Seren und mehreren Antigenen nach dieser Richtung unternommenen Versuche haben leider zu keinem entscheiden-

1) Anm.: 0,00001 Karbol entspricht dem Karbolgehalt von 0,02  $\frac{1}{2}$ -prom. karbolisiertem Serum.



den Resultate geführt. In einzelnen Fällen ergaben sich allerdings partielle Hemmungen der Hämolyse bei Immunseren auch mit Mengen, deren doppelte Quantitäten allein die Lyse nicht beeinträchtigt haben. Da wir aber partielle Hemmungen der Lyse gelegentlich auch mit normalen Pferdeseren beobachten konnten, ergibt sich auch in dieser Hinsicht kein prinzipieller Unterschied, der das Vorhandensein spezifischer Antikörper im Immunserum erwiese.

Um die von uns angewandte Methode zu demonstrieren, teilen wir nachfolgend einen Versuch mit.

Tabelle X.

31. Aug. 1909.

Komplementablenkungsversuch.

Hämolytisches System: 2,0 HBK + 0,5 Ambozeptor, 200-fach verdünnt + 0,04 Komplement, lösende Dose: Ambozeptor 0,5 400 fach und 0,03 Komplement.

Serum: Lois vom 18. Aug. 1908 (300-faches Diphtherieserum) inaktiv.

Antigene: Kochsalzaufschwemmung der 24-stünd. Agarkultur je 5,0 von Diphth.: Mac Farlan, Kopenhagen, Amerika.

Antigen (+ Serum) + 0,04 Komplement  $\frac{1}{2}$  Stunde bei 37°, dann + HBK-Ambozeptorgemisch 1 Stunde bei 37°.

## a) Auswertung der Antigene (allein).

Stamm	0,2	0,15	0,1	0,07	0,04	0,02	0,01
Mac Farlan	0	0	p	k	k	k	k
Amerika	0	Sp	k	k	k	k	k
Kopenhagen	0	0	p	k	k	k	k

## b) Auswertung des Serums (Lois) + Antigen resp. Kochsalzlösung.

Serum (Lois)	0,2	0,12	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	0,01	0,006	0,004	0,002	0,001
+ 0,04 Mac Farlan	—	—	0	—	Sp	fk	k	k	k	k	k	k
+ 0,04 Kopenhagen	—	—	0	—	Sp	fk	k	k	k	k	k	k
+ 0,05 Amerika	—	—	0	—	Sp	fk	k	k	k	k	k	k
+ NaCl Kontrolle	0	0	—	p	—	k	k	k	k	k	k	k

Es zeigt sich, daß das verwendete Diphtherieheilserum Lois mit den Antigenen aus drei verschiedenen Stämmen nur in solchen Dosen die Hämolyse hemmte, die mindestens halb so groß war, wie an sich hemmende Serummengen. Eine spezifische Komplementablenkung war hier überhaupt nicht zu konstatieren.

## III.

Unsere bisherigen Versuche hatten uns Einblick in die erhöhte Fähigkeit des Diphtheriepferdeserums, die Phagocytose zu fördern, verschafft, es erübrigte noch die Frage, die schon in den Untersuchungen von Sauerbeck berührt wurde, ob diese Fähigkeit den Antitoxinen selbst oder anderen neben ihnen im antitoxischen Serum vorhandenen Körpern zukommt. Der Nachweis des komplexen Baues der die Phagocytoseverstärkung bedingenden Körper, andererseits die Unabhängigkeit dieser Substanzen vom antitoxischen Wert der Sera scheinen uns die Möglichkeit der Identität der diesen beiden Funktionen zugrunde liegenden Immunkörper auszuschließen. Immerhin glaubten wir neue Aufschlüsse nach dieser Richtung von der Erzeugung und dem Vergleich

von Seren, die einerseits nach dem Prinzip der Antitoxingewinnung, andererseits als antibakterielle gewonnen wurden, erwarten zu können. Aus äußeren Gründen haben wir die diesbezüglichen Sera nicht von Pferden, sondern von Ziegen gewonnen. Wir haben Ziegen sowohl mit steigenden Dosen von Diphtherietoxin, als auch mit steigenden Dosen abgetöteter Kochsalzaufschwemmungen von Agarkulturen von Diphtheriebacillen subkutan injiziert.

Die mit Toxin immunisierten Ziegen erhielten als Anfangsdose 0,002 g. Trotz sehr vorsichtiger Steigerung ging uns ein Tier schon auf eine Dose von 0,02 g nach einwöchentlicher Behandlung ein. Das andere Tier (Bock 7) vertrug schließlich Dosen von 10,0 reinen Toxins bei einer Behandlungsdauer von mehr als drei Monaten. Bock 26, der mit Bakterienaufschwemmung behandelt wurde, erhielt als Anfangsdose  $\frac{1}{10}$  Oese und vertrug nach viermonatlicher Immunisierung ohne irgendwelche Störungen die kolossale Menge der Aufschwemmung einer Kolleflasche. 14 Tage nach den letzten Injektionen wurden bei beiden letztgenannten Ziegen 7 und 26 Aderlässe gemacht.

Ueberraschenderweise erwies sich nicht nur das „antibakterielle“ Serum 26, sondern auch das Serum 7 eines Tieres, das, wie hervorgehoben, 10 ccm Toxin anstandslos vertragen hatte, bei der Prüfung auf den Antitoxingehalt beim Meerschweinchen als völlig wirkungslos. 0,1 der Sera vermochte die zehnfache Dosis letalis des Toxins nicht zu neutralisieren. Doch fehlte den Seren keineswegs eine gewisse Schutzwirkung, wie unsere Versuche über die bakterizide Wirkung in vivo zeigten, so auch Tab. XI.

Tabelle XI.

19. Nov. 1910.

Peritonealversuch.

1,5 Bakt.-Aufschw. (5 ccm Bouillon auf 24-stündige Agarkultur von St. Amerika) + Serum resp. phys. Lösung ad 2,0 Meerschweinchen intraperitoneal. Nach den angegebenen Zeiten je 2 Tropfen des Peritonealexsudates in Agar von 43–45° verteilt und Platten gegossen. Sera: Ziegensera 4 (normal), 7 (Toxinimmunser.) und 26 (Bakt.-Immunser.). Kolonieenzahl nach 24 Stunden auf den Agarplatten:

Diphth.	Serum resp. phys. Lsg.	Meer- schw.	Aus- gang	Entnahme nach 1 Std.	Entnahme nach 2 Std.	Entnahme nach 4 Std.	Entnahme nach 6 $\frac{1}{2}$ Std.
1,5	phys. Lsg.	195	+ 23	sehr zahlreich	sehr zahlreich	wenig zahlr.	wenige
1,5	0,1 Ser. 4	144	+ 23	„ „	„ „	wenige	„
1,5	0,3 „ 4	662	+ 23	„ „	„ zahlreich	„	einzelne
1,5	0,1 „ 7	181	lebt	„ „	„	„	wenige
1,5	0,3 „ 7	117	„	„ „	„	„	„
1,5	0,1 „ 26	554	„	„ „	„	„	„
1,5	0,3 „ 26	756	„	„ „	„	„	„

Dieser Versuch, dessen Anordnung mit den analogen Versuchen mit Pferdeserum übereinstimmt, beweist, daß 0,1 beider Sera imstande war, die sonst tödliche Infektion zu verhindern. Dagegen ließ sich eine Keimverminderung im Peritoneum durch die Sera nicht feststellen. Dem entsprechend ergaben auch die Untersuchungen der bakteriziden Wirkung der Sera in vitro bei Komplettierung mit Komplement oder Leukocyten von Meerschweinchen negative Resultate.

Tabelle XII.

12. Nov. 1910. Bakterizider Versuch in vitro.

0,5 Bakterienaufschwemmung + Leukocyten resp. Komplement etc. + phys. Lsg.  
ad 2,0 2 Stunden bei 37°, dann 3 Oesen (= 0,01) Aussaat in Agar von 45°.

Bakterienaufschwemmung: 25-fache Verdünnung der Stammaufschwemmung  
(5 ccm phys. Lösung auf eine 24-stündige Agarkultur von St. Amerika).

Ziegensera: 7 Toxin-Immun-Tier } 1/2 Stunde bei 56° inaktiviert, mit phys.  
26 Bakt.-Immun- „ } Lösung 5-fach, 50-fach und 500-fach ver-  
15 normales „ } dünn.

Komplement: 10-fach verdünntes, frisches, normales Meerschweinchenserum.

Peritonealflüssigkeit: Peritonealexsudat von Meerschweinchen 6 Stunden  
nach Injektion von Bouillon-Kochsalzgemisch, steril in phys. Citratlösung aa aufgefangen  
zentrifugiert und abpipetiert, mit gleichen Teilen phys. Lösung verdünnt.

Leukocyten: Sediment des Peritonealexsudates in der ursprünglichen Dichte in  
phys. Lösung aufgeschwemmt.

Sterilitätskontrollen der Sera, Leukocyten und Peritonealflüssigkeit in Ordnung.

0,5 Bakt. +	0,1 Ser. 7	0,01 Ser. 7	0,001 Ser. 7	0,1 Ser. 26	0,01 Ser. 26	0,001 Ser. 26	0,1 Ser. 15	0,01 Ser. 15	0,001 Ser. 15	0,5 phys. Lösung
+ 1,0 Kompl. (1/10 verdünnt)	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
+ 1,0 Peritoneal- flüssigkeit (1/4 verd.)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
+ 1,0 Leuko- cyten	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
+ 1,0 Citrat- lösung (1/4 ver- dünnt)	+++	\	\	+++	\	\	+++	\	\	+++
+ 1,0 phys. Lösung	+++	\	\	++	\	\	+++	\	\	+++

Auffälligerweise zeigten aber die sich anschließenden Versuche  
über die phagocytosebefördernde Fähigkeit der Immunziegensera, daß  
diesen eine bakteriotrope Wirkung zukommt, die die von uns bei Pferde-  
seren beobachtete weit übertrifft: noch in 1000-facher Verdünnung  
waren beide Sera wirksam.

Tabelle XIII.

19. Okt. 1910. Opsonin- (Bakteriotropin-)Versuch.

Anordnung wie in Tab. V. Ausstriche nach 1 Stunde bei 37°.

Bakterienaufschwemmung: 24-stündige Agarkulturen von St. Amerika in 3,0 ccm  
phys. Lösung (abgetötet, nach Absetzen des Sedimentes verwendet).

Sera: Ziegenserum 26 (Bakterienimmunserum) }  
" 7 (Toxinimmunserum) } inaktiviert  
" normal }

Leukocyten von Meerschweinchen.

Serum	26	7	normal	Kontrolle ohne Serum
0,2	92 Proz. 1)	57 Proz.	52 Proz.	53 Proz.
0,02	92 "	92 "	52 "	
0,002	88 "	87 "	52 "	
0,0002	54 "	60 "		

1) Leukocyten vollgepfropft.

Die Untersuchung einer größeren Zahl von Normalziegenseren ließ dagegen meist überhaupt nicht, niemals aber in diesen Verdünnungen, eine bakteriotrope Wirkung erkennen.

Bei der hohen Wirksamkeit der Immunsera an sich entfiel die Möglichkeit, ihre Wirkung bei Komplettierung festzustellen. Es bleibe daher dahingestellt, ob sie neben den thermostabilen Bakteriotropinen auch noch komplettierbare Immunopsonine enthielten.

Aus dem negativen Ausfall der Komplementablenkungsversuche auch mit den Ziegenseren können wir nach dieser Richtung keine Schlüsse ziehen. Wir haben ebenso wie die Pferdesera auch die Ziegenimmunsera wie auch eine Reihe normaler Ziegensera mit einer ganzen Anzahl von Antigenen verschiedener Herkunft untersucht, aber keine entscheidenden Resultate erhalten. Nachfolgend geben wir aus der Reihe unserer Versuche das Protokoll einer Anordnung wieder, bei der sowohl die Immunziegensera 7 und 26 und ein normales Ziegen Serum 23 als auch Diphtheriepferdesera und normales Pferdeserum mit fünf verschiedenen Antigenen auf Komplementablenkung geprüft wurden.

Tabelle XIV.

27. April 1911.

## Komplementablenkung.

Nach Auswertung der unterhemmenden Dosen der Antigenaufschwemmungen, wie der Sera (Antigen + Serum resp. phys. Lösung ad 2,0) + 0,05 Komplement (doppelt lösende Dosis?):  $\frac{1}{2}$  Stunde bei 37°, dann + 1,5 Hammelblutambozeptorgemisch [ $\frac{1}{2}$  Stunde vorher je 1,05-proz. Hammelblut + 0,5 ( $\frac{1}{500}$ -fach) = 0,001 Ambozeptor (doppelt lösende Dosis)], Gemische 2 Stunden bei 37°.

Antigen: Aufschwemmungen von 24-stündigen Agarkulturen in je 5,0 phys. Lösung.

Sera (inaktiviert).

a) Ziegensera

7 (Toxinimmunser.) v. IX. 10

26 (Bakterienimmunser.) v. IX. 10

23 norm. Ziegen Ser. v. III. 10

b) Pferdesera

Darling (1300 Diphth.-Heilser. karbol. alt)

19 (150 " " v. XII. 10)

Orion (Meningokokkenser. " v. XI. 10)

Antigen	0,2 Dean I			0,2 Französ. V			0,2 Paris			0,2 Russ 43			0,2 Russ 49			e	
Serum	0,1	0,05	0,02	0,1	0,05	0,02	0,1	0,05	0,02	0,1	0,05	0,02	0,1	0,05	0,02	0,2	0,1
Ser. 7	p	p	fk	Sp	p	fk	p	fk	fk	p	fk	fk	p	fk	fk	p	p
Ser. 26	Sp	p	fk	Sp	p	p	Sp	p	fk	Sp	p	fk	Sp	p	fk	Sp	Sp
Ser. 23	p	p	fk	Sp	p	p	p	fk	fk	p	fk	fk	p	fk	fk	fk	k
Darling	p	p	fk	p	p	fk	p	fk	fk	p	fk	fk	p	fk	fk	fk	fk
Ser. 19	p	p	fk	p	p	fk	Sp	p	fk	p	fk	fk	p	fk	fk	p	fk
Orion	Sp	p	fk	Sp	p	fk	p	fk	fk	p	fk	fk	p	fk	fk	Sp	p
0,2 Antigen	fk	/	/	fk			k	/	/	fk	/	/	fk	/	/		
0,4 Antigen	fk			p			fk			fk			fk				

Es wurden in diesem Versuche absichtlich keine Ueberschüsse von Komplement verwendet, wie wir es in der Regel zu tun pflegten, um selbst die minimalste Hemmungswirkung erscheinen zu lassen. Trotzdem ist zwischen der Wirkung der einzelnen Sera in Verbindung mit den Antigenen nur so weit ein Unterschied vorhanden, als ein solcher hinsichtlich ihrer Eigenhemmung besteht. Das Serum 26 hemmt durchweg etwas stärker als die anderen, doch ist das bei gleicher Dosierung auch ohne Antigen der Fall. Eine spezifische Ablenkung, d. h. durch die Hälfte der nicht hemmenden Dose war auch bei den Ziegenseren nicht zu beobachten.

Der negative Ausfall dieser Versuche schließt selbstverständlich namentlich im Hinblick auf das entsprechende Verhalten der nachweis-

lich komplettierbaren Pferdesera das Vorhandensein von komplettierbaren Immunopsoninen im Ziegenserum nicht aus.

Der Vergleich der durch verschiedene Immunisierungsmethoden gewonnenen Sera 7 und 26 ließ demnach nach keiner Richtung irgendeinen Unterschied erkennen.

#### IV.

Die Frage über die Bedeutung der Antitoxine für die Phagocytose hatte sich auf diesem Wege nicht lösen lassen. Zu ihrer Entscheidung auf einem anderen Wege schien es uns zunächst von Belang, die von Sauerbeck behauptete Hemmungswirkung des Diphtherietoxins auf die Phagocytose nachzuweisen. Ohkubo hat bekanntlich eine solche in Frage gestellt und die Befunde Sauerbecks auf den Karbolgehalt des verwendeten Toxins bezogen.

Unsere Versuche, die einen deutlich hemmenden Einfluß eines Toxinzusatzes von 0,2 erkennen ließen (0,02 war unwirksam) scheinen uns Ohkubos Deutung nicht zu unterstützen, da der Zusatz einer Karbolmenge, die der 0,2 enthaltenen entspricht, nämlich 0,001, keine deutliche Hemmung zeigte. In Uebereinstimmung mit Sauerbeck glauben auch wir nur dann dem Antitoxin selbst eine Bedeutung für die Phagocytose zuschreiben zu können, wenn antitoxisches Serum, und zwar nur dieses, imstande gewesen wäre, die hemmende Wirkung des Toxins zu paralysieren. Das Ergebnis unseres diesbezüglichen Versuches, wobei sowohl Pferde- als auch Ziegenserum in Verwendung kamen, war ein sehr eigentümliches.

#### Tabelle XV.

20. April 1911.

Bakteriotropine—Antitoxine.

0,2 Diphtherieaufschwemmung + 0,2 Serum (resp. 0,02 Serum + phys. Lösung) + 0,2 Toxin (resp. phys. Lösung) + 0,2 Leukocyten.

1 Stunde bei 37°, Ausstriche aus dem Sedimente.

Aufschwemmung: 3 Agarkulturen (24 Stunden) von St. Amerika in 8 ccm phys. Lösung, gut verteilt (in toto verwendet).

Sera:

a) Ziegenserum.			b) Pferdesera.		
S. 7 Toxinimmunserum	} von August 1910	} inaktiviert	Darling (1300-f. Diphtherieheilser. alt)		
S. 26 Bakterienimmunserum			19 (150-f. „ v. Dez. 1910)		
S. 4 } normales Sera			41 (500-f. „ v. Dez. 1910)		
S. 10 }			Onkel (Dysenterieserum) Kontrollsera		
			Orion (Meningokokkenser.) Januar 1911.		

Toxin: Amerika I vom 13. Aug. 1910 (Dos. let. für Meerschweinchen 0,01).

Leukocyten: Von Meerschweinchen aus Peritonealexsudat.

Toxin	Serum	7	26	4	10	Darling	19	41	Onkel	Orion
0,2	0,2	2 Proz.	2 Proz.	6 Proz.	2 Proz.	4 Proz.	4 Proz.	2 Proz.	2 Proz.	2 Proz.
	0,02	46 „	30 „	40 „	40 „	18 „	22 „	40 „	32 „	42 „
0	0,2	28 „	5 „	34 „	8 „	8 „	2 „	2 „	16 „	22 „
	0,02	64 „	64 „	40 „	50 „	50 „	26 „	37 „	36 „	46 „

Kontrolle (ohne Serum).

+ 0,2 Toxin	8 Proz.
+ 0,02 „	20 „
+ 0,001 Karbols.	14 „
+ 0,2 phys. Kochsalzl.	20 „

Es soll zunächst davon abgesehen werden, daß fast sämtliche Sera an sich in der Menge von 0,2 nicht phagocytosebefördernd, sondern

im Gegenteile hemmend wirkten. Es war auch nicht erstaunlich, daß sie dementsprechend in dieser Konzentration die Toxinwirkung nicht aufzuheben vermochten. In der Menge von 0,02 aber zeigten sich in diesem Versuche fast alle untersuchten Sera, also auch die normalen, phagocytosebefördernd. Gleichzeitig waren sämtliche in dieser Menge imstande, die Hemmungswirkung von 0,2 Toxin völlig oder teilweise aufzuheben. Wir glauben nicht, daß die Annahme zulässig wäre, daß sämtliche, also auch die normalen Sera, Antitoxine im gewöhnlichen Sinne enthalten hatten. Auch zeigt sich beim Vergleich der Phagocytoseintensität mit und ohne Toxin unter Einwirkung der verschiedenen Sera in der Dose von 0,02 bei einigen immerhin eine deutlich schwächere Phagocytose bei Toxinzusatz. Gerade unter diesen Seren befindet sich das hochwertige Serum Darling, während bei einer Reihe normaler Sera der Toxinzusatz ganz irrelevant erscheint. Die paralyisierende Wirkung des Serumzusatzes auf die Toxinhemmung kann demnach kaum auf die Antitoxine selbst zurückgeführt werden.

Die von uns früher erwähnte Beobachtung, daß die Präparate mit konzentriertem Serumzusatz geradezu eine Verminderung der Phagocytose aufwiesen, steht in Uebereinstimmung mit diesbezüglichen Angaben Sauerbecks, doch mußten wir die Deutung, die Sauerbeck hierfür gibt, ablehnen. Sauerbeck glaubt, in den betreffenden Präparaten eine Verminderung der sichtbaren Keime feststellen zu können, und führt darauf ihre verminderte Phagocytose zurück. Sie ist für ihn daher ein Anzeichen bakterizider Fähigkeit des Serums. Direkte Beweise für diese hat Sauerbeck nicht erbracht. In unseren Seren waren — wie gezeigt — in vitro wirksame bakterizide Körper nicht vorhanden. Auch haben wir in jenen Präparaten, die die verminderte Phagocytose zeigten, niemals ein auffälliges Verschwinden der Bakterien konstatieren können. Wir glauben somit, das Phänomen entweder im Sinne der Hemmungszone bei Immunreaktionen (Amiradzibi und Bächer) oder als Folge der Schädigung der Leukocyten durch das artfremde Serum auffassen zu müssen.

Aus alledem scheint hervorzugehen, daß den Antitoxinen keine Bedeutung für die Phagocytose der Diphtheriebacillen zukommt, daß vielmehr neben ihnen im antitoxischen Serum, aber auch in normalen Seren besondere Körper enthalten sein müssen, die die Phagocytose befördern. Diese Körper sind, wie wir gesehen haben, im Pferdeserum im wesentlichen komplex gebaute, durch Meerschweinchen- oder Menschenserum komplettierbare Substanzen (Immunopsonine), zum Teil aber sind sie oder noch andere gelegentlich im Serum sich findende Stoffe thermostabil und sehr lange haltbar entsprechend den Bakteriotropinen Neufelds. Substanzen beider Art finden sich nicht nur im Immunserum, sondern auch im Normalserum, vielleicht allerdings bestehen quantitative Unterschiede zugunsten der ersteren.

Phagocytosebefördernde Substanzen enthält auch das Immunziegenserum, das, wie auch Cruveilhier fand, fast keinen Antitoxingehalt nachweisen läßt.

In Uebereinstimmung mit Lindemann kommen wir demnach zu dem Schlusse, daß phagocytosebefördernde Substanzen, nicht aber bakterizide Ambozeptoren, im Diphtherieheilsersum vorhanden sind. Ob aber für die antiinfektiöse Wirkung des Serums nur phagocytäre Antistoffe in Frage kommen, wollen wir im Hinblick auf unsere erfolglosen Bemühungen, Bakterizidie in vitro durch Leukocytenzusatz zu erlangen, so-



wie mit Rücksicht auf die geringe Schutzwirkung der stark bakteriotropen Ziegenserä vorläufig dahingestellt sein lassen. Erst wenn es gelänge, noch höherwertige bakteriotrope Serä, wie sie Lindemann für erstrebenswert hält, zu erzeugen, könnte die Entscheidung dieser Frage mit mehr Aussicht auf Erfolg in Angriff genommen werden.

### Schlusssätze.

1) Das Diphtherieheilserum schützt Meerschweinchen gegen die intraperitoneale Infektion mit Diphtheriebacillen sowohl bei gleichzeitiger als auch bei präventiver Anwendung, und bewirkt hierbei eine Keimverminderung, die mit einem vermehrten Auftreten von Leukocyten und verstärkter Phagocytose parallel geht. Hingegen läßt sich *in vitro* eine bakterizide Wirkung des Diphtherieserums weder an sich, noch in Verbindung mit Komplement oder Leukocyten nachweisen.

2) Im Pferdeserum sind komplex gebaute, durch frisches Meerschweinchen- oder Menschenserum komplettierbare Substanzen (Opsonine) enthalten, die auf Diphtheriebacillen, und zwar auch toxischer Stämme, phagocytosebefördernd wirken. Diese Wirkung kommt prinzipiell in gleicher Weise dem Normal- wie dem Immunserum zu. Ein Parallelismus der opsonischen Fähigkeit des Serums mit seiner antitoxischen Wertigkeit besteht nicht.

3) In der Regel enthält das Diphtherieheilserum keine thermostabilen, phagocytosebefördernden Substanzen. Indessen kommen solche gelegentlich im Immunserum, aber auch im normalen Pferdeserum vor. Ob diese als Bakteriotropine im Sinne Neufelds anzusprechen sind, muß somit dahingestellt bleiben.

4) Komplementablenkende Substanzen konnten im Diphtherieheilserum nicht nachgewiesen werden.

5) Von Ziegen gewonnene Immunserä zeigen eine, wenn auch geringe Schutzwirkung gegen die intraperitoneale Infektion, dagegen kaum eine antitoxische Fähigkeit. Solche Serä lassen weder *in vivo*, noch *in vitro* eine bakterizide Wirkung erkennen, hingegen enthalten sie Bakteriotropine, die sich noch in hohen Verdünnungen nachweisen lassen. Komplementbindende Substanzen werden auch bei ihnen nicht festgestellt.

6) Der Vergleich der durch Immunisierung mit Toxin oder Bakterien gewonnenen Ziegenimmunserä ließ nach keiner Richtung Unterschiede erkennen.

7) Diphtherietoxin vermag die Phagocytose *in vitro* zu hemmen, die entsprechende Menge Karbolsäure erweist sich als belanglos. Die durch das Toxin verursachte Hemmung kann durch Zusatz von verdünntem Serum neutralisiert werden. Auch diese Fähigkeit der Serä (Pferde- und Ziegenserum) hängt nicht mit ihrem Antitoxingehalt zusammen und kommt auch normalem Serum zu.

8) Durch konzentriertes Serum wird die Phagocytose fast immer beeinträchtigt.

9) Daß die antiinfektiöse Wirkung der Diphtherieheilsera nur auf ihren phagocytären Antistoffen beruht, ist nicht erwiesen.

#### Literatur.

- Bandi, Contributo allo studio dell'endotossina del bacillo di Löffler. — Indice opsonico dei seri antidifteritici. (Atti d. R. Accad. de Fisiocrit. in Siena. Ser. 4. Vol. 18. 1906. No. 4.)  
Menabuoni, Ref. Zeitschr. f. Immunitätsf. Ref. Bd. 1.  
Sauerbeck, Zeitschr. f. Immunitätsf. Bd. 3. p. 731.  
Ohkubo, Zeitschr. f. Immunitätsf. Bd. 4. No. 1.  
Lindemann, Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamte. Bd. 36. 1910. H. 2.  
Kraus u. Bächer, Zeitschr. f. Immunitätsf. Bd. 3. 1909.  
Bächer u. Laub, Ueber die Wirkungsweise des Dysenterieserums. (Zeitschr. f. Immunitätsf. Bd. 4. 1909.)  
— —, Ueber Opsonine und ihre Bedeutung für die Tuberkulinbehandlung. (Wien. klin. Wochenschr. 1908.)  
Amiradzibi u. Bächer, Zeitschr. f. Immunitätsf. Bd. 6. 1910.  
Cruveilhier, Compt. Rend. Soc. Biol. T. 69. p. 38.

*Nachdruck verboten.*

## Ueber Formalinwirkung auf Tetanustoxin und andere Bakterientoxine.

[Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institut in Wien  
(Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf.)]

Von Privatdozent Dr. M. von Elsler und Dr. E. Löwenstein.

Von dem Bestreben geleitet, eine praktische Schutzimpfungsmethode gegen den Tetanus zu finden, hat der eine<sup>1)</sup> von uns Versuche unternommen, in denen es ihm gelungen ist, durch Belichtung einer mit Formalin versetzten Tetanusbouillon das Toxin in einer solchen Weise zu beeinflussen, daß die giftigen Eigenschaften verschwanden, die immunisatorischen aber erhalten blieben. Wir wollen hier noch einmal die wesentlichen Ergebnisse dieser Versuche wiederholen.

Im diffusen Tageslicht wurde eine völlige Entgiftung der Tetanusbouillon nur dann beobachtet, wenn diese 1—2 Prom. Formalin enthielt; aber auch unter dieser Bedingung nahm die Entgiftung bei einer Flasche, die 200 ccm enthielt, geraume Zeit (9 Monate) in Anspruch. Wurden Giftlösungen, die einen Gehalt von 1—2 Prom. Formalin besaßen, dem Lichte einer  $\frac{1}{4}$  Amp. Nernstlampe ausgesetzt, so vollzog sich die Entgiftung so rasch, daß nach ca. 14 Tagen selbst 2 ccm einer Giftbouillon, von der ursprünglich 0,0003 eine Maus getötet hatten, unschädlich waren. Dieser Unterschied in der Wirkung des diffusen Tageslichtes und des Lichtes der Nernstlampe scheint nicht bloß auf quantitativen Differenzen zu beruhen; denn Versuche, in denen gleiche Quantitäten Toxin unter Farbfiltern aus Glas exponiert wurden, zeigten, daß gerade den roten Strahlen die Hauptrolle beim Entgiftungsprozeß zukommt.

1) Löwenstein, E., Ueber aktive Schutzimpfung beim Tetanus durch Toxoide. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 62. 1909.)

Die langwelligen Strahlen sind aber im Spektrum des künstlichen Lichtes reichlicher vertreten als in dem des natürlichen.

Mit auf diese Weise entgifteter Tetanusbouillon wurden Mäuse und Meerschweinchen vorbehandelt. Beide Tierarten zeigten nach der Vorbehandlung eine deutliche Immunität gegen das Tetanusgift; bei den Meerschweinchen war eine solche Immunität viel leichter zu erzeugen als bei den Mäusen. Aber nicht nur gegen das Gift, sondern auch gegen Kulturbouillon waren solche Meerschweinchen resistent. Bezüglich des zeitlichen Auftretens der Immunität wurde festgestellt, daß diese bereits am 10. Tage nachweisbar ist und bis zum 24. Tage steigt. Bemerkt sei noch, daß die Lichtvaccine auch ihr Bindungsvermögen für Antitoxin behalten hatten. Weiter konnte Löwenstein noch zeigen, daß auch die Fähigkeit, Antitoxine zu erzeugen, in dieser „Vaccine“ völlig erhalten war.

Wir haben diese Untersuchungen neuerdings aufgenommen und auf breiterer Basis durchgeführt, um über die Art des Entgiftungsvorganges und der durch die Vaccine erzeugten Immunität Aufschluß zu erlangen; ferner wurde außer dem Tetanusgift auch eine Reihe anderer bakterieller Toxine in diese Untersuchungen einbezogen. Zunächst soll über die beim Tetanusgift gewonnenen Erfahrungen berichtet werden.

## I. Tetanustoxin.

### a) Entgiftungsversuche.

Zur Herstellung der Vaccine benutzten wir Pukallfiltrate aus einer 2-proz. Traubenzuckerbouillon, die nach der Impfung 10—14 Tage bebrütet wurde. Die Giftigkeit der Kulturfiltrate schwankte zwischen 0,0001—0,0002 ccm für eine weiße Maus von 20 g. Die Bouillon wurde nach der Filtration in den meisten Versuchen mit 1,5 Prom. Formalin versetzt. Besondere Versuche über den Einfluß verschiedener Formalinkonzentrationen sollen noch im folgenden erwähnt werden. Die formalinisierte Giftbouillon wurde in flache Glasschalen in Mengen von 50—250 ccm gebracht und diese dann dem Lichte einer  $\frac{1}{4}$  Amp. Nernstlampe ausgesetzt. Wir haben dabei besonders auf guten Verschuß der Glasschalen (Abdichtung mit Paraffin) geachtet, weil die Entgiftung durch eine Einengung der Bouillon, wahrscheinlich infolge der höheren Salzkonzentration, behindert werden kann. (Die gefüllten Schalen und die Nernstlampe wurden in eine Holzkiste gestellt, deren obere Oeffnung mit schwarzem Papier bedeckt war.) Die Entfernung des Brenners von den Schalen war ca. 40 cm. Die Belichtungsdauer betrug 2—3 Wochen. Die Temperatur, auf dem Boden der Kiste gemessen, schwankte zwischen 27 und 30° C. In mehreren Versuchen haben wir Portionen der mit derselben Menge Formalin versetzten Giftbouillon im Dunkeln gehalten, und zwar im Eisschrank und bei einer Temperatur von ca. 30° C. Die folgenden Versuchsprotokolle sollen das Verhalten der Giftbouillon unter diesen verschiedenen Bedingungen veranschaulichen.

### Versuch.

Tetanustoxin vom 20. Dez. 1910. Dosis letalis für Meerschweinchen am 21. Dez. 1910 0,0002 ccm.

A. Belichtet vom 22. Dez. 1910 bis 9. Jan. 1911. Auswertung am 9. Jan.

0,1 ccm	No. 134	} sämtliche Tiere bleiben gesund.
0,5 "	" 765	
1,0 "	" 769	
3,0 "	" 699	

B. Im Dunkeln bei 30° C vom 22. Dez. 1910 bis 9. Jan. 1911. Auswertung am 9. Jan.

0,01 ccm	No. 723	} sämtliche Tiere bleiben gesund.
0,1 "	" 733	
1,0 "	" 710	
3,0 "	" 178 <sup>1)</sup>	

C. Im Eisschrank. Auswertung am 9. Jan.

0,001 ccm No. 763 14. Jan. Tetanus, † 16. Jan.  
(Weiter nicht ausgewertet.)

Aus diesem Versuche geht deutlich die entgiftende Wirkung der Belichtung hervor; aber auch die Einwirkung der Wärme im Dunkeln hat für das vorliegende Toxin denselben Erfolg gehabt, während die Giftabnahme im Eisschrank eine nur geringe war. Dieser Verlauf kann aber nicht als regelmäßig bezeichnet werden, denn wir hatten Gelegenheit, bei einem anderen Toxin ein abweichendes Verhalten zu beobachten.

Der folgende Versuch mit diesem Toxin soll auch zugleich den Einfluß verschiedener Formalinkonzentrationen demonstrieren.

#### Versuch.

Tetanustoxin vom 23. Febr. 1911.

Eine Portion wird mit 1 Prom., eine zweite mit 1,5 Prom., eine dritte mit 3 Prom. Formalin versetzt, ein Rest des Giftes ohne Zusatz geprüft. Von jeder Portion wird eine Probe belichtet, eine im Dunkeln bei 30° C gehalten, und eine in den Eisschrank gestellt. Sofort nach Zusatz des Formalins wird jede Portion an weißen Mäusen ausgewertet.

Auswertung am 23. Febr. 1911.

##### Toxin ohne Zusatz von Formalin.

0,0001 ccm	24. Febr. Tetanus, 25. Febr. tot
0,0003 "	24. " " 25. " "
0,0005 "	tot nach 24 Stunden
0,001 "	" " " 24 "

##### Toxin mit 1 Prom. Formalin.

0,0001 ccm	24. Febr. Tetanus, 25. Febr. tot
0,0003 "	tot nach 24 Stunden
0,0005 "	" " " 24 "
0,001 "	" " " 24 "

##### Toxin mit 1,5 Prom. Formalin.

0,0001 ccm	24. Febr. Tetanus, 25. Febr. tot
0,0003 "	tot nach 24 Stunden
0,0005 "	" " " 24 "
0,001 "	" " " 24 "

##### Toxin mit 3 Prom. Formalin.

0,0001 ccm	24. Febr. Tetanus, 25. Febr. tot
0,0003 "	tot nach 24 Stunden
0,0005 "	" " " 24 "
0,001 "	" " " 24 "

Auswertung am 8. März, nachdem die Giftmengen 12 Tage lang belichtet worden waren resp. im Dunkeln bei 30° C und im Eiskasten gestanden hatten.

##### Licht 1 Prom. Formalin.

0,001 ccm	gesund
0,01 "	" "
0,1 "	16. März Spur Tetanus, 21. März gesund
0,4 "	14. " Tetanus, tot 25. März

1) No. 178 nach 10 Tagen gestorben ohne Tetanus an Pneumonie.

## Licht 1,5 Prom. Formalin.

0,001 ccm gesund  
 0,01 " "  
 0,1 " "  
 0,4 " "

## Licht 3 Prom. Formalin.

0,001 ccm gesund  
 0,01 " "  
 0,1 " "  
 0,4 " "

## 30° C 1 Prom. Formalin im Dunkeln.

0,001 ccm gesund  
 0,01 " 20. März leichter Tetanus, 26. März gesund  
 0,1 " 12. März Tetanus, 13. März tot  
 0,4 " 11. " " 12. " "

## 30° C 1,5 Prom. Formalin.

0,001 ccm gesund  
 0,01 " "  
 0,1 " "  
 0,4 " 16. März Tetanus, 17. März tot

## 30° C 3 Prom. Formalin.

0,001 ccm gesund  
 0,01 " "  
 0,1 " "  
 0,4 " "

## Eisschrank 1 Prom. Formalin.

0,0001 ccm 10. März Tetanus, überlebt  
 0,0002 " 10. " " 12. März tot

## Eisschrank 1,5 Prom. Formalin.

0,0001 ccm 12. März leichter Tetanus, 20. März gesund  
 0,0002 " 12. " Tetanus, 18. März tot

## Eisschrank 3 Prom. Formalin.

0,0001 ccm gesund  
 0,0002 " "

Auswertung am 16. März, nachdem die Giftlösungen 20 Tage lang belichtet worden waren resp. im Dunkeln bei 30° C gestanden hatten.

## Licht 1 Prom. Formalin.

0,5 ccm Maus gesund  
 1,0 " "  
 5 " Meerschweinchen No. 501 23. März Tetanus, 24. März tot  
 3 " " " 504 26. " " 27. " "  
 1 " " " 502 gesund

## Licht 1,5 Prom. Formalin.

0,5 ccm Maus gesund  
 1,0 " "  
 6 " Meerschweinchen No. 64 und 73 gesund  
 4 " " " 72 " 78  
 2 " " " 44 " 45 1)

## Licht 3 Prom. Formalin.

0,5 ccm Maus gesund  
 1,0 " " "

## 30° C 1 Prom. Formalin im Dunkeln.

0,5 ccm Maus 20. März Tetanus, 21. März tot  
 1,0 " 20. " " 21. " "  
 6 " Meerschweinchen No. 40 " Tetanus, tot 20. März  
 3 " " " 41 " " 20. "  
 1 " " " 47 21. März " " 22. "

1) No. 44 tot am 28. März ohne Tetanus.

## 30° C 1,5 Prom. Formalin.

0,5 ccm	Maus	gesund				
1,0 "	"	25. März	Tetanus.	27. März	tot	
6 "	Meerschweinchen	No. 28	tot,	Tetanus	21. März	
4 "	"	"	25 "	"	22. "	
2 "	"	"	32 "	"	22. "	

## 30° 3 Prom. Formalin.

1,0 ccm Maus gesund

0,5 " " "

Eisschrank 1 Prom. Formalin (Auswertung am 21. März), so daß die Giftlösungen 25 Tage lang im Eisschrank gestanden waren.

0,0002 ccm Maus 23. März Tetanus, 26. März tot

0,0004 " " 23. " " 25. " "

## Eisschrank 0,15 Prom. Formalin.

0,0004 ccm 24. März Tetanus, 27. März schwerer Tetanus

0,0008 " 24. " " 27. " tot

0,002 " 23. " " 24. " "

## Eisschrank 3 Prom. Formalin.

0,002 ccm Maus 25. März Tetanus, 27. März schwerer Tetanus

0,01 " " 24. " " 25. " tot

0,05 " " 23. " " 24. " "

Bei der Durchsicht dieses Versuches zeigt sich, daß bei 30° C im Dunkeln gehaltenes Gift viel weniger abgeschwächt ist als das gleich lange Zeit belichtete. Besonders deutlich kommt dieses Verhalten bei den Proben mit 1,5 Prom. Formalin zum Ausdruck. Während das belichtete Toxin selbst in der Menge von 6 ccm für Meerschweinchen unschädlich war, haben von dem Wärmegift 2 ccm und auch noch weniger (in diesem Versuche nicht angeführt) Meerschweinchen tetanisch gemacht. Auch bei Mäusen war der Unterschied zwischen der Wirkung der beiden Gifte deutlich.

Weiter sollte dieser Versuch den Einfluß verschiedener Formalinkonzentrationen auf die Giftlösungen veranschaulichen. Wenn wir das Protokoll darauf ansehen, bemerken wir, daß eine Formalinkonzentration von 3 Prom. auch bei Aufbewahrung im Eisschranke nach längerer Zeit die Giftigkeit der Bouillon nicht unwesentlich herabsetzt. Nach 12 Tagen haben 0,0002 ccm der Giftlösung bei der Maus nicht mehr Tetanus erzeugt (ursprüngliche Dosis letalis 0,0001 ccm oder noch weniger, nach 25 Tagen waren zur Erzeugung eines schweren Tetanus 0,02 ccm erforderlich. Die Bouillonfiltrate mit Konzentrationen von 1,5 Prom. und 1 Prom. Formalin hatten nach 12 Tagen nur eine sehr geringe und auch nach 25 Tagen keine nennenswerte Gifteinbuße erlitten. Besonders gilt das für die Bouillon aus 1 Prom. Formalin. Im Lichte und im Dunkeln bei 30° C waren die Giftlösungen mit 3 Prom. Formalin schon bei der ersten Auswertung nach 12 Tagen vollkommen entgiftet, wenigstens für die geprüften Mengen. Für die Entgiftung im Lichte erwies sich bei dem vorliegenden Toxin der Formalingehalt von 1,5 Prom. als geeignet, indem diese Bouillon nach 20-tägiger Belichtung praktisch vollkommen unschädlich war. Die Bouillon mit 1 Prom. Formalingehalt war nach der gleichen Zeit noch etwas giftig, wenngleich auch ihre Giftigkeit enorm abgenommen hatte<sup>1)</sup>.

1) Zu diesem Versuche muß bemerkt werden, daß die Bouillon mit 1 Prom. Formalin im Verlaufe der Belichtung etwas eingeeengt worden war, mithin ein Einfluß dieses Umstandes auf den Verlauf des Entgiftungsprozesses nicht ganz ausgeschlossen werden kann.



Auf ein sehr merkwürdiges und interessantes Phänomen, das in diesem Versuche beobachtet werden kann, muß noch hingewiesen werden. Schon nach 12-tägiger, besonders aber nach 20-tägiger Belichtung resp. Erwärmung im Dunkeln fällt die Verlängerung der Inkubationszeit auf, die z. B. in dem vorliegenden Versuche bis zu 10 Tagen beträgt. In manchen dieser zahlreichen Versuche betrug die Inkubationszeit, namentlich wenn die einfache letale Dosis, also kein großer Giftüberschuß, injiziert wurde, sogar 15—20 Tage. Zugleich mit dieser Verlängerung der Inkubationszeit war eine vollständige Veränderung des Krankheitsbildes verbunden. Bei Meerschweinchen fehlte der lokale Tetanus mit tetanischer Starre der der Inkubationsstelle benachbarten Muskelgruppen völlig; es werden vielmehr die Mehrzahl der Muskeln gleichzeitig von Tetanus befallen. Die erkrankten Meerschweinchen stehen hochrückig auf den schiefen vorderen und hinteren Extremitäten, so daß der Unterleib gar nicht den Boden berührt. Die gesamte Rumpfmuskulatur und die Extremitäten sind gleichmäßig von tetanischer Starre ergriffen. Häufig konnten wir auch Trismus beobachten. Wenn man die Tiere auf die Seite legt, können sie sich nicht mehr aufrichten, auf verschiedene Reize, zuweilen schon auf Anblasen, treten auch klonische Krämpfe auf. Ein, wenn es sich um kleinere Dosen handelt, auch zwei Tage vor dem Auftreten dieser Erscheinungen fühlten sich die Meerschweinchen härter an als normale Tiere, so daß wir aus diesen Symptomen gewöhnlich den später folgenden Tetanus diagnostizieren konnten. In ganz ähnlicher Weise verlief der durch die vorbehandelten Gifte erzeugte Tetanus auch bei den Mäusen. Niemals konnten wir nach Injektion dieser Gifte lokalen Tetanus beobachten. Um dem Einwand zu begegnen, daß das beschriebene Krankheitsbild durch ein Multiplum der letalen Dosis erzeugt werde, wobei ein letaler Tetanus wegen des raschen Fortschreitens der Erkrankung übersehen werden könnte, haben wir ein Tetanusgift, das 20 Tage bei 30° C im Dunkeln gehalten wurde, genau ausgewertet.

#### Versuch.

Toxin. Meerschweinchen am 21. März 1911.

1,0	ccm	28. März allgemeiner Tetanus, 29. März tot
0,5	"	28. " " " 30. " "
0,3	"	1. April schwacher allgemeiner Tetanus, überlebt
0,2	"	gesund
0,1	"	"
0,05	"	"

Aus diesem Versuche geht hervor, daß die kleinste Dosis des Giftes, die überhaupt noch Symptome hervorrief, das beschriebene Krankheitsbild ohne lokalen Tetanus erzeugte. Wie schon erwähnt, tritt diese Form des Tetanus nach einer verlängerten Inkubationszeit auf, als deren untere Grenze wir nach unseren Versuchen bei Mäusen und Meerschweinchen 5 Tage annehmen dürfen, selbst bei Einführung eines Multiplums der letalen Dosis. Gewöhnlich ist sie aber viel länger, auch wenn große Giftmengen injiziert wurden.

Zur Erklärung der beschriebenen Tetanusform müssen die veränderten Resorptionsverhältnisse herangezogen werden. Es unterliegt wohl keinem Zweifel, daß das mit Formalin versetzte und dem Lichte oder der Wärme allein ausgesetzte Tetanusgift durch die Einwirkung des Formalins (auf die Eiweißkörper) viel langsamer aufgenommen

wird. Da also an der Injektionsstelle innerhalb einer gewissen Zeit nur sehr wenig von dem eingeführten Gifte gebunden wird, kann der größte Teil des Toxins in die Blutbahn übertreten; das im Gefäßsystem kreisende Toxin kann nun von den motorischen Nervendigungen langsam aufgenommen und zentral weitergeleitet werden, oder aber es findet auch eine direkte Giftzufuhr aus dem Blute zu den motorischen Rückenmarkszentren statt. Wenn dann nach geraumer Zeit die empfindlichen Zellen genügende Mengen von Gift enthalten, kommt es zu tetanischen Erscheinungen im Gebiete der gesamten Muskulatur.

In der Regel haben wir eine beträchtliche Verlängerung der Inkubationszeit und die damit verbundene Form des Tetanus bei den von uns gewöhnlich verwendeten Formalinkonzentrationen von 1—2 Prom. nur bei den dem Lichte oder der Wärme ausgesetzten Giftlösungen beobachtet. Die Inkubationszeit der im Eisschranke aufbewahrten Gifte nahm unter solchen Bedingungen erst nach längerer Zeit und nur in geringem Maße zu. Jedoch ließen sich auch in dieser Beziehung für verschiedene Giftlösungen, wie wir es bereits für Licht und Wärme beschrieben haben, Unterschiede erkennen.

Der folgende Versuch soll das Verhalten zweier in dieser Richtung entgegengesetzter Gifte veranschaulichen.

#### Versuch.

Toxin 25. Jan. 1911. Wird am 25. Jan. mit 2 Prom. Formalin versetzt und am 31. Jan. an weißen Mäusen ausgewertet.

0,0003 ccm	17. Febr.	Tetanus,	18. Febr.	tot
0,0005 "	17. "	"	18. "	"
0,001 "	16. "	"	17. "	"
0,003 "	16. "	"	17. "	"

Toxin 22. April 1911. Wird am 22. April mit 1,5 Prom. Formalin versetzt und bis 17. Mai im Eisschrank gehalten; am 17. Mai Auswertung an weißen Mäusen.

0,0001 ccm	18. Mai	Tetanus,	20. Mai	tot
0,0003 "	18. "	"	20. "	"
0,0005 "	18. "	"	19. "	"
0,001 "	18. "	"	19. "	"

Das Gift vom 25. Jan. hatte schon nach 5 Tagen eine sehr lange Inkubationszeit aufzuweisen, woselbst das zweite Gift selbst nach 25 Tagen noch gar keine Verlängerung der Inkubationszeit erkennen ließ. Allerdings besaß das erste Gift einen etwas höheren Formalingehalt, doch kann die so auffällig rasche und starke Verlängerung der Inkubationszeit nicht auf diesen Umstand allein zurückgeführt werden, da wir mehrere Gifte mit einem Formalingehalt von 2 Prom. hatten, die auch nach länger als 5 Tage dauerndem Aufenthalt im Eisschrank nur unbeträchtlich verlängerte Inkubationszeiten aufwiesen. Dieses Verhalten muß vielmehr in einer eigentümlichen Beschaffenheit der Giftbouillon begründet sein, die der Formalinwirkung besonders leicht zugänglich ist. Umgekehrt verhielt sich das zweite Gift dem Formalin gegenüber sehr resistent, wie auch sein Verhalten bei der Belichtung beweist.

So gelang es auch nach 31 Tage langer Exposition des Toxins vom 22. April unter der Nernstlampe nicht, dieses völlig zu entgiften. 1 ccm desselben erzeugte noch beim Meerschweinchen nach 9-tägiger

Inkubation leichteren Tetanus, ein anderes Tier, das 3 ccm des Toxins erhalten hatte, ging an Tetanus zugrunde. Es dürfte nicht ohne Interesse sein, auf dieses so differente Verhalten verschiedener Gifte gegen die Formalinwirkung im Lichte, in der Wärme und auch bei niedriger Temperatur besonders hingewiesen zu haben, zumal die Herstellung der Toxine genau in derselben Weise erfolgte und dieselben auch annähernd gleiche Wirksamkeit besaßen. Die beschriebenen Differenzen müssen daher darauf zurückgeführt werden, daß die einzelnen Stämme verschieden beeinflussbare Gifte liefern.

In der Mehrzahl der Fälle konnten wir aber schon nach 6—8-tägiger Belichtung eine recht beträchtliche Giftabnahme feststellen. Der Entgiftungsprozeß verläuft im Anfange sehr rasch, während der nach einer gewissen Belichtungsdauer zurückbleibende Giftrest bedeutend resistenter ist. Die Entgiftungskurve hat also, analog der in der Arbeit von Löwenstein enthaltenen, einen sehr steilen Anfangsteil und nähert sich dann nur ganz allmählich der Abszisse.

Bevor wir diesen Abschnitt, der das Wesentliche unserer Entgiftungsversuche mit Tetanustoxin enthält, abschließen, wollen wir noch einen Versuch über den Verlauf der Entgiftung unter Luftabschluß anführen. Von demselben Toxin wurden 40 ccm wie gewöhnlich in eine gut verschlossene Glasschale gebracht, 40 ccm in eine andere Schale gefüllt, die mit einem Zu- und Ableitungsrohr versehen war. Aus dieser Schale wurde mittels Durchleitung von Wasserstoffgas die Luft vertrieben, und hierauf beide Schalen für 4 Tage unter die Nernstlampe gestellt. Die Auswertung der beiden Toxine nach dieser Zeit ergab folgendes:

Toxin bei Luftzutritt. Injektion am 18. Jan.

0,2 ccm	23. Jan.	leichter Tetanus,	überlebt
0,4 „	23. „	Tetanus,	27. Jan. tot
0,8 „	23. „	„	24. „ „

Toxin unter Luftabschluß. Injektion am 18. Jan.

0,01 ccm	gesund
0,05 „	23. Jan. Tetanus, 27. Jan. tot
0,1 „	23. „ „ 26. „ „
Kontrollmaus	Tetanus, tot nach 70 Std.

Aus diesem Versuche geht hervor, daß das Gift in der Wasserstoffatmosphäre durch die Belichtung weniger abgeschwächt wurde als bei Anwesenheit von Sauerstoff. Das erstere ist ungefähr 8mal wirksamer als das letztere. Bekanntlich übt der Sauerstoff einen zerstörenden Einfluß auf das Tetanustoxin aus, und dieses ist unter Luftabschluß auch besser haltbar. Bei dem Belichtungsversuch muß man berücksichtigen, daß den Lichtstrahlen unter anderen auch oxydierende Wirkungen zukommen. Mit Rücksicht darauf erklärt sich die größere Wirksamkeit der unter Sauerstoffabschluß belichteten Gifte ohne weiteres.

Unser belichtetes Toxin besitzt auch die Fähigkeit, Antitoxin zu binden. Bei einem Versuch wurde ein 7 Tage belichtetes Toxin, dessen Dosis letalis von 0,0001 ccm auf 0,05 ccm für die Maus gesunken, war mit verschiedenen Mengen eines Antitoxins gemischt, von dem 0,000003 ccm eine letale Dosis neutralisierten. Von diesem Serum waren 0,003 ccm, also ungefähr die 1000-fache Menge nötig, um eine einfach letale Dosis des belichteten Toxins, das ungefähr um das 500-fache seines früheren Wertes abgenommen hatte, zu neutralisieren. Nach dieser ganz groben Berechnung dürfte die Annahme berechtigt sein, daß die

ursprünglich in 0,05 ccm vorhandene Toxinmenge trotz Verlustes ihrer Wirksamkeit noch ihr Bindungsvermögen für Antitoxin behalten hat (siehe auch Löwenstein).

#### b) Immunität.

Bezüglich der Immunität ergaben unsere Versuche Resultate, die im wesentlichen mit den von Löwenstein gemachten Erfahrungen übereinstimmen. Nach einer einmaligen Injektion von 1—5 ccm des belichteten Toxins waren Meerschweinchen selbst gegen 5000—10000 letale Dosen geschützt. Zur Erreichung eines derartigen Zustandes war eine gewisse Zeit erforderlich. Die volle Immunität hatten sich 3—4 Wochen nach der Injektion der Vaccine entwickelt. Weniger gut gelang die Schutzimpfung bei Mäusen. Durch eine einmalige Injektion war nur ein begrenzter Schutz zu erzielen.

Es gelang zwar nicht, derartig vorbehandelte Mäuse nach der Injektion von 10 letalen Dosen am Leben zu erhalten, immerhin aber war bezüglich ihrer Lebensdauer ein deutlicher Unterschied gegenüber nicht vorbehandelten Mäusen festzustellen. Auch bei Kaninchen ist uns die Immunisierung gelungen. Besonders bemerkenswert ist aber die außerordentlich hohe Immunität bei Meerschweinchen, die schon durch eine einzige Injektion zu erzielen ist, da es sonst nicht ohne weiteres gelingt, dieses für das Tetanusgift so hoch empfindliche Tier aktiv zu immunisieren. Nicht nur mit dem belichteten Toxin, sondern auch mit dem bei 30° C im Dunkeln gehaltenen Gift ist es möglich, Meerschweinchen gegen die Tetanuserkrankung zu schützen. So z. B. war ein Meerschweinchen, das 1 ccm einer auf solche Weise entgifteten Tetanusbouillon erhalten hatte, gegen die nachträgliche Injektion von 1000 letalen Dosen immun.

Eine weitere Frage war die, worauf die durch die Vorbehandlung der Tiere mit Vaccine erzielte Immunität beruht. Von vorneherein war daran zu denken, daß ein durch die Vaccine erzeugtes Antitoxin den Schutz bedinge. In der Tat konnten wir bei einer Anzahl von Meerschweinchen, deren Blutserum in dieser Richtung untersucht wurde, einen beträchtlichen Gehalt an Tetanusantitoxin feststellen. Die Prüfung geschah in der Weise, daß eine sicher tödliche Dosis eines eingestellten Trockengiftes mit fallenden Mengen Meerschweinchen serum gemischt weißen Mäusen injiziert wurde. Der Neutralisationswert dieser Meerschweinchen sera schwankte zwischen 0,03 und 0,005 ccm. In derselben Versuchsreihe fanden sich aber auch Tiere, deren Blutserum nur wenig oder fast gar kein Antitoxin enthielt. Wir haben daher die Organe eines solchen Meerschweinchens, in dessen Blut kein Antitoxin nachweisbar war, auf Neutralisationsvermögen für Tetanusgift geprüft; gleichzeitig wurden auch die Organe eines normalen Tieres in der gleichen Weise verarbeitet.

Die Tiere wurden entblutet; mit physiologischer Kochsalzlösung gründlich durchgespült und abgewogene Mengen der verschiedenen Organe mit Kochsalzlösung verrieben. Dann wurde je 1 ccm dieser Organ aufschwemmungen resp. des defibrinierten Blutes mit je 1, 5 und 10 letalen Dosen Tetanusgift vermischt und weißen Mäusen eingespritzt. Von Organen wurden injiziert Gehirn, Leber, Milz, Lunge und Knochenmark. Außer dem Gehirn war keines der angeführten Organe weder des vorbehandelten, noch des normalen Meerschweinchens, ebensowenig

das Blut, imstande, das Gift zu neutralisieren, nur das Knochenmark bewirkte eine Lebensverlängerung<sup>1)</sup>.

Wie bereits erwähnt wurde, schwankt der Antitoxingehalt des Blutserums bei den einzelnen Tieren und fehlt bei manchen nahezu ganz. Sehr instruktiv ist in dieser Beziehung der folgende Versuch: Meerschweinchen 308 und 313 hatten beide je 1 ccm belichteten Toxins erhalten. Die Auswertung ihres Blutserums auf Antitoxingehalt an Mäusen ergab folgende Werte:

**Meerschweinchen No. 308.**

0,01 ccm Serum + 0,00002 g Toxin	Tetanus, tot nach 70 Stunden
0,03 " " + 0,00002 " "	" " " 90 "
0,1 " " + 0,00002 " "	" " " 90 "
0,3 " " + 0,00002 " "	" " " 114 "

**Meerschweinchen No. 313.**

0,01 ccm Serum + 0,00002 g Toxin	gesund
0,03 " " + 0,00002 " "	" " "
0,1 " " + 0,00002 " "	" " "
0,3 " " + 0,00002 " "	" " "

Bei ganz gleicher Vorbehandlung hatte das eine Tier beträchtliche Mengen Antitoxin gebildet, wogegen das andere nur Spuren davon in seinem Blutserum enthielt. 4 Tage nach dieser Auswertung wurde beiden Tieren je 1000 letale Dosen Tetanustoxin injiziert. Gleichzeitig wurde einem gleich schweren nicht vorbehandelten Meerschweinchen dieselbe Giftmenge einverleibt. Nach ca. 18 Stunden war das normale Meerschweinchen bereits an Tetanus zugrunde gegangen. Meerschweinchen No. 308 hatte nach 18 Stunden starken Tetanus, No. 313 war vollkommen gesund. Nach 30 Stunden war 308 ebenfalls tot, 313 ganz frei von Tetanus. No. 308 zeigte also gegenüber dem unvorbehandelten Kontrolltier eine Lebensverlängerung von ca. 12 Stunden, die auf den, wenn auch geringen, Antitoxingehalt seines Blutserums zurückzuführen ist. No. 313 mit seinem hohen Antitoxingehalt blieb gesund. In zahlreichen andern Versuchen konnten wir ganz ähnliche Beobachtungen machen. In derselben Versuchsreihe hatten wir immune und nicht-immune Tiere, und so oft eine Antitoxinbestimmung gemacht worden war, zeigte sich, daß die Tiere mit beträchtlichem Antitoxingehalt im Blutserum auch einen hohen Grad von Immunität besaßen, der bei geringerem Antitoxingehalt abnahm. Es besteht also ein strenger Parallelismus zwischen Immunität und Antitoxinwert. Dabei konnten wir nicht selten beobachten, daß Tiere, die mehr Vaccine bekommen hatten, keine Immunität erworben hatten, während Tiere, die mit geringeren Mengen derselben Vaccine vorbehandelt worden waren, gegen eine hohe Toxindosis geschützt waren. So z. B. ging ein Meerschweinchen, das 3,5 ccm eines bei 30° C im Dunkeln gehaltenen Giftes erhalten hatte, bei nachträglicher Injektion eines Trockengiftes an Tetanus ein, ein anderes Meerschweinchen, das nur mit 1 ccm dieser Vaccine vorbehandelt worden war, zeigte sich gegen die gleiche Giftmenge resistent.

Aus diesen Beobachtungen geht hervor, daß der Eintritt der Immunität ganz von der Individualität des betreffenden Tieres abhängig ist, d. h. daß nur dann eine nennenswerte Immunität eintritt, wenn das betreffende Tier imstande ist, reichlich Antitoxin zu bilden. Da auch die Produktion anderer Antikörper seitens verschiedener Individuen

1) Vergl. dazu die Arbeit von S. Loewe, Biochem. Zeitschr. Bd. 33. 1911.

derselben Art großen Schwankungen unterliegt, wird bei jeder aktiven Schutzimpfungsmethode mit diesem Umstand zu rechnen sein, und mit Rücksicht darauf die wechselnde Resistenz der also Vaccinierten eine Erklärung finden.

Zur Prüfung der Immunität bei unseren Versuchstieren haben wir das Gift gewöhnlich subkutan oder intramuskulär injiziert. In einigen Fällen haben wir auch Versuche mit intraneuraler Injektion gemacht. Bei einem mit 4 ccm Lichtvaccine vorbehandelten Meerschweinchen ergab die Serumauswertung folgendes Resultat:

0,1 ccm Serum	+ 0,00002 g Toxin	Tetanus, tot	nach 96 Stunden
0,03 " "	+ 0,00002 " "	" "	60 "
0,01 " "	+ 0,00002 " "	" "	48 "
Kontrollmaus		" "	48 "

Dieses Meerschweinchen erhielt am 26. IV. 0,0005—0,001 g eines Trockengiftes, von dem die letale Dosis 0,00002 g beträgt, in den N. ischiadicus injiziert. Dieselbe Menge bekam ein gleich schweres Kontrolltier. Dieses hatte am nächsten Tage bereits schweren Tetanus und war am 28. IV. morgens schon tot. Das vorbehandelte Tier zeigte am 28. früh noch keine Tetanussymptome. Erst am 28. trat lokaler Tetanus auf und am 29. starb das Meerschweinchen. Es war also eine deutliche Verzögerung im Verlaufe der Erkrankung gegenüber dem Kontrolltiere festzustellen. Ein höherer Grad von Immunität war bei diesem Tiere infolge des niederen Antitoxingehaltes im Blutserum nicht zu erwarten. Dagegen besaßen zwei andere Meerschweinchen, deren Blutserum bei der üblichen Auswertung gegen 0,00002 g Toxin noch in der Menge von 0,01 ccm weiße Mäuse vor Tetanus schützte, eine ausgesprochene Immunität. Diesen beiden Tieren wurden ca. 100 letale Dosen in den N. ischiadicus injiziert, ohne daß die Tiere irgendwelche Tetanussymptome darboten. Es trat nicht einmal lokaler Tetanus auf. Von den gleichzeitig mit derselben Menge injizierten Kontrolltieren starb eines nach ca. 30 Stunden, das zweite nach 40 Stunden an Tetanus. Ebenso besaßen zwei von uns untersuchte Kaninchen eine vollkommene Immunität gegen die intraneurale Injektion. Diese beiden Tiere waren zweimal mit belichtetem Toxin vorbehandelt worden. Das Serum des einen Kaninchens No. 298 neutralisierte in der Menge von 0,01 ccm ein bis zwei letale Dosen für Mäuse, vom Serum des zweiten Kaninchens No. 402 genügte sogar noch 0,001 ccm zur Neutralisation dieser Giftmenge. Dem Kaninchen No. 298 wurde 0,15 ccm einer konzentrierten Tetanusgiftlösung, die 0,2 g Toxin in 1 ccm enthält<sup>1)</sup>, also ca. 0,03 g Trockengift in den N. ischiadicus der rechten Seite injiziert. Das Tier blieb vollkommen gesund und zeigte nicht einmal Erscheinungen von lokalem Tetanus. Dem zweiten Kaninchen (No. 402) wurden sogar in beide Nervi ischiadici je 0,15 ccm dieser Giftlösung injiziert, ohne daß bei dem Tiere irgendwelche Tetanussymptome auftraten.

Also auch gegen eine intraneurale Injektion des Giftes bestand, wenn nur genügend Antitoxin gebildet worden war, vollkommene Immunität. Diese Versuche stehen in guter Uebereinstimmung mit noch nicht veröffentlichten Untersuchungen von v. Graff, dem es gelang, Kaninchen nach intraneuraler Injektion von Tetanusgift durch reichliche Zufuhr von Antitoxin auf intravenösem Wege vor Tetanus zu schützen oder

1) Die tödliche Dosis dieses Giftes bei intramuskulärer für entsprechend schwere Kaninchen beträgt 0,03 g.

mindestens länger am Leben zu erhalten. Diese unsere Versuche sind um so bemerkenswerter, als die intraneurale Injektion die strengste Prüfung auf Tetanusimmunität darstellt und nach einem Versuche von H. Meyer und Ransom<sup>1)</sup> ein aktiv immunisiertes Kaninchen trotz hohem Antitoxingehalt im Blutserum gegen intraneurale Injektion nicht immun war. Allerdings bekam das Tier nach der ersten intraneuralen Injektion keinen Tetanus, ebensowenig nach einer subkutanen, sondern erst nach einer dritten Einspritzung in den N. ischiadicus.

Ueber das Schicksal des in den Organismus einverleibten Toxins liegen zahlreiche Untersuchungen vor. Versuche, das injizierte Gift im Blute des Tieres wiederzufinden, haben je nach der Tierart zu etwas verschiedenen Resultaten geführt. So verschwand das Gift beim Kaninchen rascher aus der Blutbahn als beim Meerschweinchen, obwohl letzteres viel empfänglicher für Tetanus ist. Auch in verschiedenen Organen gelang der Nachweis des Giftes. Wir selbst haben in dieser Richtung Versuche bei mit Vaccine vorbehandelten und normalen Meerschweinchen gemacht.

### Versuch.

Einem vorbehandelten Meerschweinchen, dessen Blutserum bei der üblichen Auswertung an weißen Mäusen in der Menge von 0,01 ccm noch vor Tetanus schützte und ein gleich schweres normales Tier erhielten je 2000 letale Dosen Toxin injiziert. Das Kontrolltier hatte nach 13 Stunden beginnenden Tetanus und war nach 20 Stunden im sterbenden Zustande. Zu dieser Zeit wurde das Tier entblutet, von den Organen Leber, Milz und Gehirn mit Kochsalzlösung zu einer dichten Aufschwemmung zerrieben, von der 5 ccm ca. 1 g Organ enthielten. Die größten Teilchen wurden durch kurzes Zentrifugieren entfernt und die Aufschwemmungen, ebenso auch das Blut in Mengen von je 2 ccm Meerschweinchen injiziert. In der gleichen Weise wurde das vorbehandelte Meerschweinchen, das 20 Stunden nach der Injektion vollkommen gesund war, verarbeitet.

Injektion am 16. Mai 1911.

#### Normales Meerschweinchen.

Milz	Meerschweinchen No. 450	19. Mai	Tetanus,	22. Mai	Tetanus
Leber	" 428	18. "	"	20. "	tot
Blut	" 370	18. "	"	20. "	"
Gehirn	" 260	18. "	gesund		

#### Vorbehandeltes Meerschweinchen.

Milz	Meerschweinchen No. 436	gesund
Leber	" 322	"
Gehirn	" 178	"
Blut	" 143	"

Derartige Versuche haben wir mit analogem Erfolge auch mit Uebertragung der Organaufschwemmungen und des Blutes auf Mäuse wiederholt. Das Blut und die untersuchten Organe, mit Ausnahme des Gehirns, nicht vorbehandelter Meerschweinchen enthielten nach ca. 24 Stunden Toxin; selbst wenn geringere Mengen Gift als im vorerwähnten Versuche (ca. 500 letale Dosen) injiziert worden waren, gelang noch der Nachweis desselben. Bei den vorbehandelten Meerschweinchen, deren Blut Antitoxin enthielt, konnte dagegen niemals weder im Blute noch in den Organen Tetanustoxin nachgewiesen werden.

1) Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 49. 1903.



Wurden dagegen vorbehandelten Meerschweinchen, deren Blutserum nur Spuren von Antitoxin enthielt, Tetanustoxin injiziert, so erkrankten diese, wie bereits in einem früheren Versuche gezeigt wurde, an Tetanus und das Blut solcher Tiere enthielt auch durch die Uebertragung auf Meerschweinchen und Mäuse nachweisbares Toxin.

## II. Vibriotoxin, Diphtherietoxin, Dysenterietoxin, Tuberkulin.

### a) Vibriotoxin.

Das Bouillonfiltrat einer 10-tägigen Kultur von *Vibrio El Tor* V wurde mit 1:1000 Formalin versetzt und dem Lichte einer  $\frac{1}{4}$  Amp. Nernstlampe ausgesetzt. Die Auswertung desselben, im Eisschranke aufbewahrten Bouillonfiltrates hatte ergeben, daß 1 ccm bei intravenöser Injektion 500—600 g schwere Kaninchen innerhalb einer Stunde tötet. Als blutlösende Dosis wurde 0,02 ccm pro 1 ccm Kaninchenblut festgestellt. Schon nach 2-tägiger Belichtung war die lösende Dosis auf 0,04 ccm gestiegen. Nach 6-tägiger Belichtung war selbst 1 ccm der Bouillon nicht mehr imstande, 1 ccm Kaninchenblut zu lösen. Auch die toxische Wirkung auf Kaninchen hatte abgenommen. 5 ccm töteten zwar noch ein Kaninchen innerhalb 3 Stunden, mit 2 und 1 ccm injizierte Tiere blieben aber am Leben. Nach 10-tägiger Belichtung wurden noch 5 ccm von einem Kaninchen vertragen.

Sowohl die hämolytische Wirkung als auch die toxische auf Kaninchen hatte somit durch die Belichtung deutlich abgenommen, die erstere anscheinend stärker als die letztere. Ob jedoch diese beobachtete Differenz in der Abnahme der Wirksamkeit genügend ist, die Existenz zweier verschiedener Gifte in der Bouillon anzunehmen, muß dahingestellt bleiben.

Wir haben weiter versucht, mit dem durch Belichtung abgeschwächten Lysin Blutkörperchen vor der Wirkung des unveränderten Giftes zu schützen, indem wir je 1 ccm Kaninchenblut mit verschiedenen Mengen (0,1—2 ccm) des belichteten Hämolysins versetzten, mehrere Stunden stehen ließen und dann 0,05 ccm der wirksamen Bouillon zusetzten. Eine Hemmung der Lyse bei dieser Versuchsanordnung war nicht mit Sicherheit festzustellen, vielleicht deshalb, weil größere Mengen der belichteten Bouillon, die eventuell eine Schutzwirkung auszuüben fähig wären, noch etwas unverändertes Lysin enthielten, die zusammen mit dem frischen Gifte eine Lösung herbeiführten.

Aus dem Ausfall dieser Versuche könnte man also schließen, daß das Lysin durch die Belichtung vollkommen zerstört wird, so daß es auch sein Bindungsvermögen einbüßt, oder es wäre auch nicht die Möglichkeit auszuschließen, daß das unveränderte Hämolysin das belichtete aus seiner Verbindung mit den roten Blutzellen verdrängt. Die folgenden Versuche scheinen für die erstere Annahme zu sprechen. Von einem spezifischen Antitoxin wurde die neutralisierende Dosis für 0,05 ccm des unveränderten Hämolysins ausgewertet und diese mit verschiedenen Mengen (0,1—0,8 ccm) des belichteten Toxins versetzt. Nach 4-stünd. Kontakt wurde je 1 ccm Kaninchenblut und 0,05 ccm frisches Toxin zugesetzt. Nur in den Röhrchen, die größere Mengen (0,4—0,8 ccm) der belichteten Bouillon enthielten, trat geringe Lyse ein, die andern blieben ungelöst. Bei den ersteren ist aber daran zu denken, daß in denselben noch kleine Mengen im unveränderten Toxin enthalten waren. Man darf wohl aus diesen Versuchen schließen, daß das belichtete

Toxin nicht mehr imstande ist, Antitoxin zu binden. Die geringfügige Abnahme der antitoxischen Wirkung bei Zusatz größerer Mengen (0,4 bis 0,8 ccm) des Lichttoxins kann dadurch erklärt werden, daß in diesem noch etwas unverändertes Gift vorhanden war, welches befähigt war, geringe Mengen des Antitoxins zu binden.

Schließlich wurde auch ein Versuch gemacht, ob mit belichtetem Toxin vorbehandelte Kaninchen eine Immunität gegen das Gift erworben haben. Eine an zwei vorbehandelten Kaninchen angestellte Prüfung ergab ein negatives Resultat.

#### b) Diphtheriegift.

Ein Diphtheriegift, dessen letale Dosis 0,02 ccm betrug, wurde im Verhältnis 1:1000 mit Formalin versetzt und belichtet. Nach 6 Tagen war 0,1 ccm des Toxins nicht mehr imstande, ein Meerschweinchen zu töten, ein mit 0,5 ccm injiziertes Tier starb nach 2 Tagen. Nach 13-tägiger Belichtung tötete 0,5 ccm erst am 4. Tage und nach 20-tägiger Dauer der Bestrahlung überlebte das Tier, dem 0,5 ccm des Giftes injiziert worden waren, bekam aber noch immer ein ziemlich großes Infiltrat. Von demselben Gifte wurde eine Portion im Dunkeln in der Wärme gehalten. Von diesem Gifte tötete nach 14 Tagen noch 0,06 ccm ein Meerschweinchen in 4 Tagen. Die Entgiftung war also im Lichte deutlich stärker.

Einer anderen Portion desselben Giftes haben wir 2 Prom. Formalin zugesetzt. Eine Probe wurde durch 24 Tage belichtet, eine andere ebenso lange im Dunkeln bei 30° C aufbewahrt. Die Auswertung der beiden Gifte nach 24 Tagen ergab:

##### Licht-Toxin.

0,2 ccm	No. 26	leichte Verdickung an Injektionsstelle, sonst gesund
0,4 "	" 57	Infiltrat, überlebt
0,8 "	" 72	" "

##### Dunkel-Toxin.

0,05 ccm	No. 91	derbes Infiltrat, überlebt
0,1 "	" 64	tot nach 3 Tagen
0,2 "	" 63	" " 2 "

Auch bei diesem Versuche hatte das belichtete Toxin viel mehr an Wirksamkeit einbüßt als das bloß erwärmte. Eine weitere Ausdehnung des Versuches auf im ganzen 35 Tage änderte indes nichts mehr an dem Resultate.

Außer diesem Gift haben wir auch noch ein anderes Diphtherietoxin untersucht, dessen Formalingehalt 1,5 Prom. betrug. Nach 32-tägiger Belichtung konnten wir 0,5 ccm injizieren, ohne daß die Meerschweinchen starben; eine weitere Entgiftung gelang nicht. Die Dosis letalis dieses Giftes betrug 0,025—0,03 ccm. Die Abschwächung des Diphtherietoxins war also in unseren Versuchen trotz der langen Belichtung eine verhältnismäßig geringe, namentlich im Vergleiche zum Tetanustoxin. Ein weiterer bemerkenswerter Unterschied gegenüber dem letzteren Gifte bestand auch darin, daß beim belichteten Diphtherietoxin, selbst wenn die Formalinkonzentration 2 Prom. betrug, niemals auch nur die geringste Verlängerung der Inkubationszeit zu beobachten war.

Der Versuch, bei Meerschweinchen durch Vorbehandlung mit belichteter Diphtheriebouillon Immunität zu erzeugen, hat ein negatives Resultat ergeben. Mehreren Meerschweinchen, denen wir verschiedene

Mengen (0,1—0,4 ccm) des belichteten Toxins injiziert hatten, wurden nach 15 Tagen 10 letale Dosen Diphtherietoxin eingespritzt. Diese Tiere starben alle innerhalb 48 Stunden.

#### c) Dysenterietoxin.

Dieses Gift ist sowohl bei der Aufbewahrung als auch gegen verschiedene Einflüsse sehr resistent. Auch bei unseren Belichtungsversuchen zeigte sich das Dysenterietoxin wenig beeinflussbar. Das Bouillonfiltrat einer Dysenteriekultur wurde mit 2 Prom. Formalin versetzt und belichtet. Die Dosis letalis des im Eisschrank aufbewahrten Toxins war 0,5 ccm für Kaninchen. Nach 25-tägiger Belichtung war noch keine sichere Abnahme der Giftigkeit festzustellen. Erst nach 40-tägiger Dauer des Versuches konnten wir 1 ccm injizieren, ohne daß das Tier starb. Das im Dunkeln bei 30° C aufbewahrte Gift tötete auch noch nach 40 Tagen ein Kaninchen in der Menge von 1 ccm.

#### d) Tuberkulin.

Kochsches Tuberkulin wurde im Verhältnis 2:1000 mit Formalin versetzt und einen Monat lang belichtet, bzw. im Brut- und Eisschrank gehalten. Die mit 0,02 und 0,002 vorgenommene Prüfung an tuberkulösen Meerschweinchen ergab bei allen drei Tuberkulinen deutliche Reaktionen für 0,02 ccm. Bei Injektion von 0,002 ccm des belichteten Tuberkulins war die Reaktion nur sehr schwach, bei den anderen beiden Tuberkulinen noch deutlich.

Da das Tuberkulin bei seiner Herstellung stark eingeengt wird, mithin einen hohen Salzgehalt enthielt, der, wie bereits erwähnt, auf die Entgiftung einen hemmenden Einfluß ausüben kann, haben wir in einem anderen Versuche 20 ccm Tuberkulin mit 40 ccm Aqua dest. versetzt und dieses verdünnte Tuberkulin 30 Tage lang belichtet. Auch mit diesem Präparate fanden wir bei der Prüfung weder einen quantitativen noch einen zeitlichen Unterschied gegenüber den Kontrollen, d. h. die Reaktion trat auch mit dem belichteten Tuberkulin nach der üblichen Zeit auf. Eine merkbare Beeinflussung des Tuberkulins durch die Belichtung war mithin in unseren Versuchen nicht festzustellen, was bei der bekannten außerordentlichen Resistenz dieses Tuberkelbacillenproduktes gegen die verschiedensten Eingriffe, selbst gegen das Kochen, nicht verwundern kann.

Wenn wir die hier mitgeteilten Versuche überblicken, so muß uns das besondere Verhalten des Tetanustoxins sofort auffallen. Während die andern untersuchten Gifte durch die Belichtung mit Formalinzusatz nur in relativ geringem Maße oder auch gar nicht abgeschwächt werden, haben wir gesehen, daß das Tetanustoxin unter den gleichen Bedingungen völlig oder mindestens in außerordentlich hohem Grade entgiftet wird. Dieser Entgiftungsprozeß verläuft im Anfange sehr rasch, so daß schon innerhalb der ersten 48 Stunden der Giftwert ca. um das 100-fache abnimmt, der übrig bleibende Teil des Giftes ist aber viel resistenter, und bei dem einen von uns untersuchten Toxin war ein gewisser Giftrest auch nach langer Belichtung noch erhalten.

Auch die Erwärmung auf ca. 30° C ohne Belichtung bewirkt nach unseren Versuchen einen ähnlichen Entgiftungsprozeß der formalinisierten Tetanusbouillon, wenngleich dieser in den meisten Fällen weniger vollkommen zu verlaufen scheint als unter dem Einfluß des

Lichtes. Wir möchten daher, namentlich auch mit Rücksicht auf frühere Versuche von Löwenstein, daß das Formalin für den raschen Verlauf der Giftabschwächung von größter Bedeutung ist, das Wesentliche dieses Entgiftungsprozesses in der Formalinwirkung sehen.

Das Formalin wirkt noch in hohen Verdünnungen auf Eiweißlösungen. Die Formalinisierung des Eiweiß- resp. Giftmoleküls, welche durch Licht und Wärme sehr beschleunigt wird, bewirkt den Entgiftungsprozeß. Nach einem Versuche von Löwenstein<sup>1)</sup> kommt den roten Strahlen, also den Wärmestrahlen, die Hauptrolle bei der Entgiftung durch Licht zu, so daß unsere Versuche über Giftabschwächung durch Wärme im Dunkeln damit in guter Uebereinstimmung stehen. Neben den Wärmestrahlen scheinen bei der Belichtung auch noch andere Strahlen für den Entgiftungsprozeß eine Bedeutung zu haben. So wäre namentlich mit Rücksicht auf den verschiedenen Grad der Entgiftung bei Belichtung unter Sauerstoffabschluß und bei Sauerstoffzutritt an die oxydierende Wirkung der Lichtstrahlen zu denken. Wir sind jedoch in Anbetracht der mannigfaltigen Wirkungen, welche die von einer Lichtquelle ausgehenden Strahlen auszuüben vermögen, derzeit nicht in der Lage, Näheres darüber auszusagen, welchen Strahlen resp. Strahlenwirkungen außer den Wärmestrahlen für den Entgiftungsprozeß der formalinisierten Tetanusbouillon eine Rolle zufällt.

Daß die Einwirkung des Formalins auf das Eiweiß-Giftmolekül die Giftabnahme bewirkt, dafür spricht auch die Beobachtung, daß höhere Formalinkonzentrationen selbst im Eisschranke eine Abschwächung des Tetanustoxins erzeugen. Da der Prozeß der Formalinwirkung auf das Eiweiß in der Kälte viel langsamer verläuft, läßt sich eine merkliche Giftabnahme erst bei höheren Formalinkonzentrationen feststellen. Wirken bloß geringere Formalinmengen von 1—1,5 Prom. im Eisschranke auf das Tetanustoxin ein, so scheint eine Fixierung des Giftmoleküls stattzufinden, denn solche Gifte lassen sich durch längere Zeit ohne irgendeinen oder höchstens nur ganz geringen Verlust ihrer Wirksamkeit aufbewahren. Der Zusatz von Formalin in derartigen Mengen zur Tetanusbouillon kann daher als einfaches Konservierungsmittel empfohlen werden, da ja dieses Toxin in flüssigem Zustande nicht längere Zeit haltbar ist.

Wie bereits beschrieben wurde, haben wir nach Injektion der durch Licht oder Wärme abgeschwächten Toxine ein eigentümliches, vom gewöhnlichen Tetanus verschiedenes Krankheitsbild beobachtet, dessen wichtigste Merkmale die auffallende Verlängerung der Inkubationszeit und das Fehlen des lokalen Tetanus waren. Die lange Inkubationszeit wird durch die Formalineinwirkung hervorgerufen, indem das durch Formalin veränderte Giftmolekül zweifellos langsamer resorbiert wird. Bezüglich des Ausbleibens des lokalen Tetanus haben wir bereits früher ausgeführt, daß infolge der erschwerten Resorption nur ein sehr geringer Teil des Giftes von den Nervenendigungen der Injektionsstelle aufgenommen wird, der größte Teil desselben somit auf dem Wege der Blutbahn zu den übrigen Nervenstämmen geführt werden kann. Außerdem muß auch daran gedacht werden, daß den motorischen Rückenmarkszellen direkt vom Blute Gift zugeführt wird, auf welche Möglichkeit auch Sawamura<sup>2)</sup> in seinen Untersuchungen über experimentellen Tetanus hinweist.

1) l. c.

2) Arb. a. d. Inst. z. Erforsch. d. Infektionskrankh. in Bern. 1909. H. 4.

Für die durch Vorbehandlung mit dem belichteten oder erwärmten Toxin erzeugte Immunität ist, wie aus den angeführten Versuchen hervorgeht, das gebildete Antitoxin verantwortlich. Interessant ist es, daß es z. B. beim Meerschweinchen gelingt, schon durch eine einmalige Injektion eine so ausgiebige Antitoxinproduktion und dadurch so hochgradige Immunität zu erzeugen. Allerdings muß man dabei bedenken, daß die einverleibte Menge der Vaccine im Verhältnis zu der ursprünglichen Giftigkeit der Bouillon eine sehr bedeutende ist. Da nun unsere Vaccine imstande ist, reichlich Antitoxin zu bilden — ungefähr in dem Maße als ihrem ursprünglichen Giftgehalte entsprechen würde — so könnte man sich wohl vorstellen, daß die durch das Formalin veränderten Giftmoleküle trotz Verlust ihrer krankmachenden Fähigkeit im Tierkörper noch geeignet sind, die Bildung von Antitoxin auszulösen. Daneben muß die Frage offen bleiben, inwieweit Reste von unverändertem Gifte in der Vaccine für die Antitoxinbildung in Betracht kommen.

Bei anderen Giften konnten wir durch die gleiche Versuchsanordnung keine oder nur eine verhältnismäßig geringe Abschwächung erzielen. Diese anderen Gifte, Vibriotoxin, Diphtherie-, namentlich aber Dysenteriegift und Tuberkulin sind auch sonst viel resistenter als das Tetanustoxin, was schon daraus hervorgeht, daß sie sich lange Zeit in wirksamem Zustande aufbewahren lassen. Zum Unterschiede vom Tetanustoxin zeigten diese Gifte nach der Vorbehandlung niemals eine Verlängerung der Inkubationszeit. Aus diesem vom Tetanustoxin abweichenden Verhalten dürfen wir wohl auch schließen, daß den oben erwähnten Toxinen eine andere chemische Konstitution zukommt als dem Starrkrampfgift, dessen Moleküle vom Formalin besonders leicht beeinflußt werden, eine Beobachtung, die die bekannten Unterschiede in der chemischen Natur der bakteriellen Gifte noch ergänzt.

Infolge der schwachen oder fehlenden Formalinwirkung konnten wir für die übrigen Toxine keine Immunität in der Weise wie gegen das Tetanustoxin erreichen. Es muß aber auch berücksichtigt werden, daß, wie z. B. beim Diphtheriegift, für das ausgedehntere Versuche von uns vorliegen, wegen der noch erhaltenen Giftigkeit nur verhältnismäßig geringe Mengen injiziert werden konnten, die eben nicht genügend waren, um eine ausgiebige Antitoxinproduktion anzuregen.

### Versuchsergebnisse.

Das mit 1—2 Prom. Formalin versetzte Tetanusbouillongift verliert, dem Lichte einer  $\frac{1}{4}$  Amp.-Nernstlampe durch 2—3 Wochen ausgesetzt, seine Wirksamkeit vollständig oder wird zum mindesten sehr stark abgeschwächt. Der Verlauf der Entgiftung ist im Anfange ein rascher und wird später sehr verlangsamt.

Die Wärme (ca. 30° C) allein ohne Belichtung bewirkt einen ähnlichen Entgiftungsprozeß der mit Formalin versetzten Tetanusbouillon, wenngleich dieser Prozeß in den meisten Fällen weniger rasch und vollkommen verläuft als im Lichte.

Bei der Belichtung unter Wasserstoff, also ohne Sauerstoffzutritt, verliert das Gift ebenfalls weniger von seiner Wirksamkeit, als wenn der Sauerstoff der Luft einwirken kann.

Im Eisschrank aufbewahrt, verlieren die Bouillongifte bei den erwähnten Formalinkonzentrationen nichts oder nur wenig von ihrer Toxi-

zität, erst bei höheren Formalinkonzentrationen (3 Prom.) tritt eine stärkere Abnahme ein.

Die von den einzelnen Stämmen produzierten Gifte weisen eine verschiedene Resistenz sowohl gegen Belichtung, Wärme allein und auch bei der Aufbewahrung im Eisschrank auf.

Die durch Licht und Wärme veränderten Gifte wirken erst nach einer oft bedeutend verlängerten Inkubationszeit. Damit im Zusammenhange steht, daß nach Injektion dieser Gifte kein lokaler Tetanus entsteht; sondern nach Ablauf der Inkubationszeit sogleich der größte Teil der Körpermuskulatur von Tetanus ergriffen ist.

Durch einmalige Vorbehandlung mit den beschriebenen Giften läßt sich bei Meerschweinchen und Kaninchen eine hohe Immunität erzielen; weniger ausgebildet ist sie bei Mäusen. Der Impfschutz besteht auch gegen intraneurale Injektion des Giftes.

Die erzeugte Immunität ist eine antitoxische; sie hängt ab von der Bildung des spezifischen Antitoxins und ihr Grad steht in direktem Verhältnis zu der Menge des produzierten Antitoxins. Infolgedessen ist die Höhe der Immunität bei den einzelnen Tieren großen Schwankungen unterworfen.

Das Toxin des *Vibrio El Tor* V, insbesondere seine lösende Wirkung auf rote Blutkörperchen, wurde durch die Belichtung deutlich abgeschwächt. Eine nicht unbeträchtliche Entgiftung konnte auch beim Diphtherietoxin erzielt werden. Sehr gering war der Einfluß der Belichtung auf Dysenterietoxin. Für das Tuberkulin konnte überhaupt keine merkliche Abschwächung festgestellt werden.

Zum Unterschiede vom Tetanustoxin zeigten das belichtete Vibriotoxin und Diphtheriegift keine Verlängerung der Inkubationszeit. Ebenso wenig ließ sich mit den beiden letzteren Giften nach einmaliger Vorbehandlung eine Immunität erzielen.

### Inhalt.

- Bäcker, St. u. Laub, M.**, Zur Frage der antiinfektiösen Wirkung des Diphtherieheilserum, p. 254.  
**Bäcker, St. u. Menschikoff, V. K.**, Ueber die ätiologische Bedeutung des Bordet'schen Keuchhustenbacillus und den Versuch einer spezifischen Therapie der Pertussis, p. 218.  
**Bäcker, St. u. Wakushima, T.**, Das Verhalten des opsonischen Komplementes und der Antikörper bei der Anaphylaxie, p. 238.  
**v. Eisler, M. u. Löwenstein, E.**, Ueber Formalinwirkung auf Tetanustoxin und andere Bakterientoxine, p. 271.  
**v. Graff, Erwin u. Menschikoff, V.**,

- Experimentelle Beiträge zum Mechanismus der Antitoxinwirkung, p. 226.  
**Karsner, H. T.**, Die Lungen bei der Anaphylaxie, p. 247.  
**Kraus, R., Hammerschmidt, J. u. Zia, Zecky**, Weitere Studien über Cholera-vibrionen. Ueber das Verhalten der aus der Epidemie in Arabien 1908 stammenden Cholera-vibrionen bei der Agglutination mit niederwertigem Serum, p. 207.  
**Swellengrebel, M. H.**, Zur Kenntnis des Dimorphismus von *Trypanosoma gambiense* (var. *rhodesiense*), p. 193.  
**v. Zubrzycki, J.**, Ueber die Aktivierung des Kobragiftes durch Organextrakte, p. 232.

# Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 61. Heft 4/5.

Ausgegeben am 16. Dezember 1911.

*Nachdruck verboten.*

## Beiträge zur Kenntnis der hämoglobinophilen Bacillen, mit besonderer Berücksichtigung des Bordetschen Bacillus.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Breslau  
(Direktor: Geheimrat Prof. Dr. R. Pfeiffer).]

Von Dr. **Odaira**, Marineoberstabsarzt aus Tokio.

Seit den Veröffentlichungen über den Keuchhustenerreger durch Bordet und Gengou ist die Frage der Aetiologie des Keuchhustens Gegenstand vieler Untersuchungen gewesen. Schon vor Bordet und Gengou haben Jochmann und Krause bei Keuchhusten influenzaähnliche Stäbchen gefunden, sind aber einerseits die Beantwortung der Frage, ob diese influenzaähnlichen Stäbchen tatsächlich die Ursache des Keuchhustens sind, schuldig geblieben, andererseits haben die beiden genannten Autoren keine wirklich durchgreifenden Unterschiede zwischen dem vermeintlichen Keuchhustenerreger und dem Influenzabacillus mitgeteilt. Bordet und Gengou<sup>1)</sup> haben in ihren Arbeiten über gewisse morphologische und Wachstumsunterschiede sowohl als über eine spezifische Trennung ihres Bacillus von dem Influenzabacillus berichtet. Nach Bordet und Gengou haben C. Fraenkel, Klimenko, Seiffert, Arnheim u. a. die Frage der ätiologischen Bedeutung und der Spezifität des Bordetschen Bacillus für den Keuchhusten in eingehenden Untersuchungen bearbeitet und gelangten zu dem Resultate, daß die Bordetschen Angaben auf Richtigkeit beruhen.

Während Jochmann und Krause<sup>2)</sup> gelegentlich einer Keuchhustenerpidemie in Hamburg in 18 Fällen (darunter 3 Sektionsfälle) influenzaähnliche, hämoglobinophile, gramnegative, kleinste Stäbchen gefunden haben, hat Klimenko<sup>3)</sup> nur in 5 von 76 Fällen, und zwar in der ersten und zweiten Woche der Krampfperiode Bacillen gezüchtet, die er als Keuchhustenerreger anspricht. Fraenkel<sup>4)</sup> fand bei 38 Fällen 8mal im Sputum durch Züchtung den Keuchhustenerreger. M. Wollstein<sup>5)</sup> im New York Foundling Asylum hat in 29 von 30 Fällen Bordetsche Stäbchen gefunden. Seiffert<sup>6)</sup> hat im ganzen 16 Fälle untersucht und gelang es ihm in 12 Fällen, den Bordetschen Bacillus rein herauszuzüchten. Arnheim<sup>7)</sup> hat 20 Sputa und 5 Sektionsfälle von Keuchhusten untersucht und in 6 Fällen aus dem Sputum den Bordetschen Bacillus isoliert. Bei den Sektionsfällen hatte er negative Resultate.

Wie wir sehen, ist in den Angaben der einzelnen Autoren ein großer Unterschied, was die Häufigkeit des Befundes von Bordetschen Bacillen anlangt, zu konstatieren. Dies könnte einerseits auf die Art der Untersuchungsmethode zurückzuführen sein, in dem vielleicht einer oder der

1) Annal. de l'Institut. Pasteur. T. 20. 1906. No. 9; T. 21. 1909. No. 9.

2) Zeitschr. f. Hyg. Bd. 36. 1901.

3) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 48. 1909.

4) München. med. Wochenschr. 1908. No. 32.

5) The Journ. of experiment. Med. Vol. VII. 1905. No. 4.

6) München. med. Wochenschr. 1909. No. 3.

7) Berlin. klin. Wochenschr. 1908. No. 31.



andere der Autoren auch bei spärlichsten Keuchhustenerregern dieselben herauszuzüchten verstand, während den übrigen Untersuchern derartige spärliche Keuchhustenbacillen entgehen konnten. Des ferneren könnte für derartige Differenzen die Zeit der Untersuchung verantwortlich gemacht werden, wissen wir ja von anderen Infektionskrankheiten her, daß die Erreger entweder in ganz bestimmten Stadien besonders zahlreich oder überhaupt nur in bestimmten Stadien der Erkrankung zu finden sind. Schließlich ist die Frage aufzuwerfen, ob denn der Keuchhusten eine ätiologisch einheitliche Erkrankung ist, oder ob er vielleicht nur einen Symptomenkomplex darstellt, der bei Infektionen der Luftwege verschiedener Art zutage treten kann. Etwas Ähnliches kennen wir ja auch bei anderen ansteckenden Krankheiten, so z. B. bei dem Brechdurchfall und bei der Grippe. So kann ein klinisch fast gleicher Symptomenkomplex sowohl bei der Cholera asiatica, als auch bei der Cholera nostras konstatiert werden, obzwar hier ätiologisch, epidemiologisch und klinisch eine ganz scharfe Trennung besteht. Ebenso können Krankheiten, welche unter dem klinischen Bilde der Influenza verlaufen, einmal echte Influenzafälle, ein andermal sogenannte Saisongrippen sein, welche ätiologisch nichts mit Influenza zu tun haben und untereinander selbst ätiologisch verschieden sein können.

Auf Anregung von Herrn Geheimrat Prof. Dr. R. Pfeiffer habe ich es versucht, in eingehenden Untersuchungen die oben berührten Fragen zu behandeln. Herr Geheimrat Pfeiffer sowohl wie dem Abteilungsleiter des Instituts, Herrn Prof. Dr. R. Scheller, unter deren Leitung ich die Untersuchungen angestellt habe, bin ich zu besonderem Danke verpflichtet.

Ich habe bis jetzt Gelegenheit gehabt, 42 Keuchhustenfälle von der hiesigen Universitäts-Kinderklinik zu untersuchen. Für die Ueberlassung des Materials danke ich Herrn Prof. Dr. Czerny und Herrn Prof. Dr. C. Frh. v. Pirquet und Herrn Privatdozenten Dr. H. Vogt herzlichst.

Die Methode der Untersuchung war folgende:

Was die Entnahme des Auswurfs anbelangt, so geschah sie entweder durch sterile Tupfer, ähnlich der Entnahme diphtherieverdächtigen Materials von der Rachenhöhle des Kindes, oder es wurde im Momente eines Hustenanfalls dem Kinde eine sterile Petri-Schale vorgehalten. In den meisten der Fälle wurde das Material gleichzeitig nach beiden Methoden entnommen.

Ich möchte hier gleich bemerken, daß es von größter Wichtigkeit ist, namentlich zum Zwecke der Kultivierung, das Material so schnell wie möglich zu verarbeiten. Zu diesem Zwecke müssen bereits vor der Entnahme sämtliche Nährböden hergestellt sein, so daß man fast unmittelbar nach der Entnahme das Material auf die Nährböden bringen kann.

Untersucht wurde jedesmal selbstverständlich sowohl im Originalpräparat, als auch durch Züchtung.

Die zur Züchtung verwandten Nährböden waren folgende:

- 1) Der nach Angabe von Bordet und Gengou verfertigte Kartoffel-, Glycerin-, Kaninchenblutagar<sup>1)</sup>;
- 2) mit Taubenblut bestrichener Agar (nach R. Pfeiffer);
- 3) zur Kontrolle gewöhnlicher Agar.

1) Annal. de l'Institut. Pasteur. 1906. No. 9.

Sofort nach der Entnahme wurden Teile des Sputums mehrmals in steriler physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und so sorgfältig von den anhaftenden Bakterien der Mundhöhle befreit. Sodann wurde eine Oese dieses Materials nach dem Vorgange R. Pfeiffers<sup>1)</sup> in 1 ccm Nährbouillon gut verteilt und hiervon mittels Platinöse die Aussaat vorgenommen, während die Originalpräparate von dem gewaschenen unverdünnten Sputum hergestellt wurden.

Unter 42 Fällen, die ich untersucht habe und die in Tabelle I zusammengestellt sind, befanden sich 35 Sputa und 7 Sektionfälle; davon wurden in 12 Fällen in dem Sputum, in 4 Fällen in dem Leichenmaterial influenzaähnliche, gramnegative, hämoglobinophile Bakterien gefunden. In den anderen Fällen wurden nur Diplokokken, Streptokokken, Staphylokokken, Sarcinen und *Micrococcus catarrhalis* nachgewiesen (Tab. I und II).

In den 16 Fällen, in denen ich hämoglobinophile Bakterien finden konnte, zeigte sich folgendes Bild: Im mikroskopischen Präparate bereits ließen sich in einigen Fällen durch längere Tingierung mit verdünnter Karbolfuchsinlösung sehr gut färbbare kleinste Bacillen konstatieren, welche in ihrer Form sich von den Influenzabacillen nicht unterscheiden ließen, während ich in anderen Fällen ebenfalls kleinste Bacillen in großer Zahl fand, welche aber etwas kürzer und dicker als die Influenzabacillen, meist etwas oval geformt, öfters bipolar färbbar waren. Beide Bacillenformen kamen häufig in großen Haufen oder in fischzugähnlicher Anordnung vor und lagen auch sehr oft im Innern von Zellen.

Was die kulturellen Resultate anlangt, so waren aus den 16 Fällen, in denen mikroskopisch influenzaähnliche Bacillen konstatiert werden konnten, in 12 Fällen diese Bakterien kultivierbar. Sie wuchsen auf den beiden zuerst genannten bluthaltigen Nährböden, und zwar nur auf ihnen, während auf gewöhnlichem Agar kein Wachstum erfolgte. Makroskopisch verhielten sich die Züchtungsergebnisse fast gleich. Es waren die bekannten Befunde, wie sie bei Influenza vorkommen, zu verzeichnen:

Feine tautropfenförmige Kolonien, welche, mit dem unbewaffneten Auge betrachtet, an der Grenze der Sichtbarkeit standen; diese Kolonien waren auf dem Taubenblutagar nur dort zu bemerken, wo sich die Taubenblutstriche befanden, während auf den blutfreien Stellen ein Wachstum nicht zu konstatieren war.

Die von einzelnen Kolonien gewonnenen Reinkulturen zeigten dort, wo das Ausgangsmaterial die dickeren Stäbchen enthielt, bald üppigeres Wachstum als in den anderen Fällen, namentlich auf dem Bordet-Agar war eine üppige Rasenbildung zu konstatieren. Die aus diesen Fällen gewonnenen Kulturen zeigten nach einigen Generationen auch auf gewöhnlichem Agar Wachstum, welches, sobald mit der Zeit Gewöhnung eingetreten war, üppiger wurde, jedoch an Ueppigkeit hinter dem Wachstum auf den Blutnährboden zurückstand. In denjenigen Fällen, in welchen das Ausstrichpräparat die ganz influenzaähnlichen feinsten Stäbchen erkennen ließ, konnte trotz aller Bemühungen ein Wachstum auf gewöhnlichem Agar nicht erzielt werden.

Was die mikroskopische Untersuchung der Kulturen anlangt, so zeigten diejenigen Kulturen, in deren Ausgangsmaterial wir die feineren Stäbchen gefunden haben, durchweg dasselbe Bild wie die Influenza-

1) Zeitschr. f. Hyg. Bd. 13. 1893.

**Tabelle I.**  
**Uebersicht über das Gesamtmateriale.**

N.	Name des Falles	Alter und Geschlecht	Klinische Diagnose	Anatomische Diagnose	Krankheitsstadium	Untersuchungsmaterial	Sind influenza-ähnliche Stäbchen im Originalpräparate (Ausstrichpräparate) gefunden worden?	Sind influenza-ähnliche Stäbchen aus dem Untersuchungsmaterial gezüchtet worden?	Sonstige gefundene Mikroorganismen
1	A. Schirma	3 Mon., m.	Pertussis?	Bronchopneumonie, Tracheitis	Postmortale Untersuchung (bei Sekt.)	Kehlkopf-, Luftröhrensekret und Exsudat aus der pneumon. Lunge	ja	ja	s. Tabelle II
2	W. Tekly	8 Jahre, m.	Pneumon., Pertussis	—	Stadium convulsivum	Sputum	nein	nein	Pneumokokk., Staphylokokk.
3	H. Weidlich	4 Jahre, w.	Bronchitis, Pertussis?	—	Stadium convulsivum	Sputum	nein	nein	Diplokokken, Staphylokokk.
4	L. Kühn	8 Mon., w.	Pneumonie, Pertussis	Bronchopneumonie, Tracheitis, Bronchitis	Postmortale Untersuchung (bei Sekt.)	Kehlkopf-, Luftröhrensekret und Exsudat aus der pneumon. Lunge	ja	ja	s. Tabelle II
5	E. Scholz	3 1/2 Jahre, w.	Pertussis?	—	3. Woche des Stadium convulsivum	Sputum	ja	ja	s. Tabelle II
6	H. Tänza	5 Mon., m.	Bronchitis, Pertussis	—	Ende des Stadium convulsivum	Sputum	nein	nein	Streptokokken, große gramneg. Kokken
7	M. Tänza	5 Jahre, w.	Pneumon., Pleuritis (Tuberkulose?), Pertussis	—	Anfang d. Stadium convulsivum	Sputum	ja	nein	s. Tabelle II
8	A. Tänza	4 Mon., m.	Pharyngitis, Pertussis	—	Anfang d. Stadium convulsivum	Sputum	ja	nein	s. Tabelle II
9	R. Staritzke	2 Mon., w.	Koryza, Pertussis?	—	?	Sputum	nein	nein	Diplokokken, Sarcinen

Name des Falles	Alter und Geschlecht	Klinische Diagnose	Anatomische Diagnose	Krankheitsstadium	Untersuchungsmaterial	Sind influenza-ähnliche Stäbchen im Originalpräparate (Ausschüßpräparate) gefunden worden?	Sind influenza-ähnliche Stäbchen aus dem Untersuchungsmaterial gezüchtet worden?	Sonstige gefundene Mikroorganismen
10 F. Hermann	3 Jahre, w.	Pertussis	—	Ende des Stadium convulsivum (kurz vor Stadium decemementi)	Sputum	nein	nein	Streptokokken, Staphylokokken.
11 F. Hetschel	9/4 Jahr, w.	Pertussis	—	?	Sputum	nein	nein	Diplokokken, große gramneg. Kokken
12 K. Tilger	3 Mon., w.	Rhachitis, Encephalitis, Pertussis	Bronchopneumonie	Postmortale Untersuchung (bei Sekt.)	Kehlkopf-, Luftröhrensekret und Exsudat aus der pneumon. Lunge	nein	nein	Streptokokken, Pneumokokken
13 F. Böhm	?, w.	Pertussis	—	Ende des Stadium convulsivum (kurz vor Stadium decemementi)	Sputum	nein	nein	Große grampos. Kokken
14 K. Böhm	8 Mon. m.	Pharyngitis, Bronchitis, Pertussis	—	Ende des Stadium convulsivum	Sputum	nein	nein	Sarcinen, Pneumokokken
15 C. Jaworsky	4 Jahre, w.	Diphtherie, Bronchitis, Pertussis	—	3. Woche des Stadium convulsivum	Sputum	nein	nein	Diplokokken, Streptokokken, große grampositive Kokken
16 W. Wolf	8 Jahre, m.	Pertussis	—	1. Woche des Stadium convulsivum (kurz nach dem Stadium catarrhalis)	Sputum	ja	ja	s. Tabelle II
17 D. Winkler	6 Jahre, w.	Pertussis	—	1. Woche des Stadium convulsivum (kurz nach dem Stadium catarrhalis)	Sputum	ja	ja	s. Tabelle II



Nr.	Name des Falles	Alter und Geschlecht	Klinische Diagnose	Anatomische Diagnose	Krankheitsstadium	Untersuchungsmaterial	Sind influenzähnliche Stäbchen im Originalpräparate (Ausstrichpräparate) gefunden worden?	Sind influenzähnliche Stäbchen aus dem Untersuchungsmaterial gezüchtet worden?	Sonst gefundene Mikroorganismen
18	H. Rother	6 Mon., m.	Pharyngitis, Pertussis	—	3. Woche des Stadium convulsivum	Sputum	nein	nein	Micrococcus catarrhalis, Streptokokken s. Tabelle II
19	W. Böhm	2 Jahre, m.	Pertussis	Bronchopneumonie	Postmortale Untersuchung (bei Sekt.)	Kehlkopf-, Luftröhrensekret und Exsudat aus der pneumon. Lunge	ja	ja	s. Tabelle II
20	K. Wolf	4 Mon., m.	Pertussis	—	2. Woche des Stadium convulsivum	Sputum	ja	ja	s. Tabelle II
21	R. Gzeward	3 Jahre, m.	Pharyngitis, Pertussis?	—	Ende des Stadium convulsivum	Sputum	nein	nein	Micrococcus catarrhalis, Sarcinen, Pneumokokken
22	W. Zimmer	?, m.	Pneumonie, Bronchitis, Pertussis?	Bronchopneumonie	Postmortale Untersuchung (bei Sekt.)	Kehlkopf-, Luftröhrensekret und Exsudat aus der pneumon. Lunge	nein	nein	Micrococcus catarrhalis, Streptokokken
23	P. Elberling	9 Jahre, m.	Bronchitis, Pertussis	—	Ende des Stadium convulsivum	Sputum	nein	nein	Diplokokken, Streptokokken, steril
24	E. Müller	1/2 Jahr, m.	Bronchitis, Pertussis	Bronchopneumonie	Postmortale Untersuchung (bei Sekt.)	Kehlkopf-, Luftröhrensekret und Exsudat aus der pneumon. Lunge	nein	nein	Sarcinen, Staphylokokk. Staphylokokk. Pneumokokk., große gramneg. Kokken
25	G. Töplitz	3 3/4 Jahre, w.	Pertussis	—	Anfang des Stadium convulsivum	Sputum	nein	nein	steril
26	A. Lobsch	?, m.	Pertussis?	—	?	Sputum	nein	nein	Sarcinen, Staphylokokk.
27	E. Lobsch	3 Jahre, w.	Pneumonie, Pertussis	—	Seit 10 Woch. Husten	Sputum	nein	nein	Pneumokokk., große gramneg. Kokken
28	K. Pelz	?, w.	Pertussis	—	Seit 8 Woch. Husten	Sputum	nein	nein	steril
29	E. Schneider	5 3/4 Jahre, w.	Pertussis	—	Stad. convulsivum	Sputum	nein	nein	Diplokokken



Name des Falles	Alter und Geschlecht	Klinische Diagnose	Anatomische Diagnose	Krankheitsstadium	Untersuchungsmaterial	Sind influenza-ähnliche Stäbchen im Originalpräparate (Ausstrichpräparate) gefunden worden?	Sind influenza-ähnliche Stäbchen aus dem Untersuchungsmaterial gezüchtet worden?	Sonst gefundene Mikroorganismen
30 K. Hahn	4 <sup>3</sup> / <sub>4</sub> Jahre, w.	Pertussis	—	Anfang d. Stadium convulsivum	Sputum	ja	nein	s. Tabelle II
31 H. Hahn	4 <sup>3</sup> / <sub>4</sub> Jahre, w.	Cystitis, Pertussis	—	1. Woche des Stad. convulsivum	Sputum	ja	ja	s. Tabelle II
32 H. Weise	7 Jahre, m.	Pertussis	—	Ende des Stadium convulsivum	Sputum	ja	nein	s. Tabelle II
33 H. Bruss	1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Mon., m.	Pertussis	—	Ende des Stadium convulsivum	Sputum	nein	nein	Pneumokokk., Sarcinen, Staphylokokk.
34 L. Lieber	?	Pertussis?	—	?	Sputum	nein	nein	Große gram-positive Kokken
35 P. Dohmen	3 Jahre, w.	Pertussis	—	Anfang des Stadium convulsivum	Sputum	nein	nein	Streptokokken, Staphylokokk.
36 R. Schoter	1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Mon., m.	Pertussis	—	?	Sputum	ja	ja	s. Tabelle II
37 O. Schnbert	7 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Jahre, m.	Pertussis	—	Ende des Stadium convulsivum	Sputum	nein	nein	Streptokokken Staphylokokk.
38 M. Lagma	8 Jahre, m.	Pertussis	—	Ende des Stadium convulsivum (kurz vor dem Stadium decrementi)	Sputum	nein	nein	Pneumokokken, Streptokokken
39 T. Steiner	3 Wochen, m.	Pertussis	—	Anfang des Stadium convulsivum	Sputum	nein	nein	steril
40 W. Weiss	5 Jahre, m.	Pertussis	—	1. Woche des Stad. convulsivum	Sputum	ja	ja	s. Tabelle II
41 G. Zöllner	3 Jahre, m.	Pertussis	—	Ende des Stadium convulsivum	Sputum	ja	ja	s. Tabelle II
42 K. Griebisch	3 Mon., m.	Pneumonie, Pertussis	Broncho-pneumonie	Postmortale Untersuchung (bei Sekt.)	Exsudat aus der pneumon. Lunge	ja	ja	s. Tabelle II

**Tabelle II.**  
**Uebersicht über diejenigen Fälle, in denen influenzaähnliche Stäbchen nachgewiesen wurden.**

No.	Name des Falles	Untersuchungsmaterial Originalpräparat	Kulturelles Verhalten der influenzaähnlichen Stäbchen		Form und Größe der gezüchteten influenzaähnlichen Stäbchen	Demnach welcher Typus?	Agglutination
			Kolonien auf dem Bordetschen Agar	Kolonien auf dem Taubenblutagar			
1	A. Schirma	Sekret aus dem Kehlkopf und der Luftröhre (bei Sektion). Leukocyten, Plattenepithelien, Staphylokokken, viel influenzaähnliche Stäbchen. Exsudat aus der pneumon. Lunge. Viele Leukocyten, Alveolarepithelien, influenzaähnliche Stäbchen in geringer Zahl. (Influenza-bacillus-Typus?)	Dicht gedrängt stehende kleine tautropfenähnliche Kolonien, influenzaähnliche gramnegative Stäbchen. Reinkultur.	Stark lichtbrechende, kleine tautropfenähnliche Kolonien, influenzaähnliche gramnegative Stäbchen. Einzelne Staphylokokkenkolonien.	Sehr kleine Stäbchen von der Form u. Größe des Influenza-bacillus. Scheinfädenbildung.	Feinerer Typus.	Positiv bis 1:80 durch Anti-Influenza-serum.
2	L. Kühr	Sekret aus dem Kehlkopf und der Luftröhre (bei Sektion). Leukocyten, Plattenepithelien, influenzaähnliche Stäbchen in geringer Zahl. Exsudat aus der pneumonischen Lunge (bei Sektion). Leukocyten, Alveolarepithelien, rote Blutkörperchen, Pneumokokken, wenig influenzaähnliche Stäbchen. (Influenzatyphus?)	Dicht gedrängt stehende kleine tautropfenähnliche Kolonien, influenzaähnliche gramnegative Stäbchen. Fast in Reinkultur einige Pneumokokkenkolonien.	Lichtbrechende, tautropfenähnliche Kolonien, influenzaähnliche gramnegative Stäbchen. Einzelne Kolonien von Staphylokokken und Fränkelschen Diplobacillen.	Sehr kleine Stäbchen von der Form u. Größe des Influenza-bacillus.	Feinerer Typus.	Positiv bis 1:80 durch Anti-Influenza-serum.
3	E. Scholz	Sputum. Mono- und polynukleäre Leukocyten, Plattenepithelien, Streptokokken, massenhaft influenzaähnliche Stäbchen. (Influenzatyphus?)	Feine kleine tautropfenähnliche Kolonien, influenzaähnliche gramnegative Stäbchen. Einzelne Streptokokkenkolonien.	Lichtbrechende kleine tautropfenähnliche Kolonien, influenzaähnliche gramnegative Stäbchen. Staphylokokken u. Streptokokkenkolonien.	Sehr kleine Stäbchen von der Form u. Größe des Influenza-bacillus.	Feinerer Typus.	Stark positiv bis 1:80. Schw. positiv bis 1:160 durch Anti-influenzaser.
4	W. Wolf	Sputum. Leukocyten, Plattenepithelien, Kettenkokken, massenhaft influenzaähnliche Stäbchen, zum Teil in den Zellen liegend. (Bordetscher Bacillustypus?)	Tautropfenähnliche kleine gelbbraune Kolonien, influenzaähnliche gramnegative Stäbchen. Pneumokokkenkolonien.	Tautropfenähnlich bei durchscheinendem Licht bläulich aussehende Kolonien, influenzaähnliche gramnegative Stäbchen. Kolonien der Sarcinen, Staphylokokken u. Pneumokokken.	Dicke, eiförmige, sehr kleine Kurzstäbchen.	Dickerer Typus.	Stark positiv bis 1:80. Schw. positiv bis 1:320 durch Anti-Bordet-Ser.



No.	Name des Falles	Untersuchungsmaterial Originalpräparat	Kulturelles Verhalten der influenzaähnlichen Stäbchen		Form und Größe der gezüchteten influenzaähn- lichen Stäbchen	Demnach welcher Typus?	Agglutina- tion
			Kolonien auf dem Bordetschen Agar	Kolonien auf dem Taubenblutagar			
5	D. Winkler	Sputum. Befunde wie No. 4. (Bordet-Typus?)	Tautropfenähn. glänzende gelbliche Kolonien, in- fluenzaähn. gramnega- tive Stäbchen. Einige Pneumokokken- und Streptokokkenkolonien.	Wie No. 4.	Sehr kleine dicke und kurze Stäb- chen mit abge- rundeten Ecken.	Dickerer Typus.	Stark positiv bis 1:160. Schw. positiv bis 1:320 durch Anti- Bordet-Ser.
6	W. Böhm	Sekret aus dem Kehlkopf und der Luftröhre (bei Sektion). Leukocyten, Flimmerepithelien, Plattenepithelien, massen- haft influenzaähnliche Stäbchen, zum Teil in großen Haufen, zum Teil in fisch- zugähnlicher Anordnung. Exsudat aus der pneumon. Lunge (bei Sektion). Leu- kocyten, rote Blutkörper- chen, Pneumokokken, in- fluenzaähnliche Stäbchen. (Bordet-Typus?)	Dicht gedrängt stehende, kleine tautropfenähn- liche gelblich-braune Ko- lonien, influenzaähn- liche gramnegative Stäbchen fast in Reinkultur, nur einige Pneumokokken- kolonien.	Tautropfenähn. bei durch- scheinendem Licht bläu- lich aussehende Kolo- nien, influenzaähnliche gramnegative Stäbchen. Vereinzelte Kolonien von Streptokokken, Sta- phylokokken und Pneumo- kokken.	Sehr kleine dicke u. kurze Stäb- chen mit abge- rundeten Ecken.	Dickerer Typus.	Stark positiv bis 1:80. Schw. positiv bis 1:160 durch Anti- Bordet-Ser.
7	K. Wolf	Sputum. Poly- und mono- nukleäre Leukocyten, Pneu- mokokken, spärliche in- fluenzaähnliche Stäbchen. (Bordet-Typus?)	Tautropfenähn. glänzende gelbliche Kolonien, in- fluenzaähn. gramnega- tive Stäbchen. Pneumo- kokken- und Staphylo- kokkenkolonien.	Tautropfenähn. bei durch- scheinendem Licht bläu- lich aussehende Kolo- nien, influenzaähnliche gramnegative Stäbchen. Kolonien von Staphylo- kokken und Micrococcus catarrhalis.	Sehr kleine dicke ovoide Kurz- stäbchen.	Dickerer Typus.	Stark positiv bis 1:80. Schw. positiv bis 1:160 durch Anti- Bordet-Ser.
8	H. Hahn	Sputum. Leukocyten, Platten- epithelien, Flimmerepithelien, massenhaft influenza- ähnliche Stäbchen. (Bordet- Typus?)	Tautropfenähn. gelblich- braune Kolonien, in- fluenzaähn. gramnega- tive Stäbchen. Staphylo- kokkenkolonien.	Wie No. 7. Staphylokok- kenkolonien.	Sehr kleine dicke u. oval geformte Kurzstäbchen.	Dickerer Typus.	Positiv bis 1:160 durch Anti-Bordet- Serum.

No.	Name des Falles	Untersuchungsmaterial Originalpräparat	Kulturelles Verhalten der influenzaähnlichen Stäbchen		Form und Größe der gezüchteten influenzaähn- lichen Stäbchen	Demnach welcher Typus?	Agglutina- tion
			Kolonien auf dem Bordetschen Agar	Kolonien auf dem Taubenblutagar			
9	R. Schöter	Sputum. Leukocyten, Streptokokken, Diplokokken, Staphylokokken, wenig influenzaähnliche Stäbchen. (Influenzatyphus?)	Tautropfenähnliche durchscheinende Kolonien, influenzaähnliche gramnegative Stäbchen. Einzelne Pneumokokken und Staphylokokkenkolonien.	Starke lichtbrechende klein-tautropfenähnliche Kolonien, influenzaähnliche gramnegative Stäbchen. Streptokokken und Staphylokokkenkolonien.	Feine Stäbchen von der Form und Größe der Influenzabacill.	Feinerer Typus.	Stark positiv bis 1:80. Schw. positiv bis 1:320 durch Anti-Influenza-serum.
10	W. Weiss	Sputum. Leukocyten, Plattenepithelien, Pneumokokken, massenhaft influenzaähnliche Stäbchen. (Bordet-Typus?)	Tautropfenähnliche glänzende braune Kolonien, influenzaähnliche gramnegative Stäbchen. Kolonien von Pneumokokken und Micrococcus catarrhalis.	Tautropfenähnlich bei durchscheinendem Licht bläulich aussehende Kolonien, influenzaähnliche gramnegative Stäbchen. Kolonien von Staphylokokken, Streptokokken und Micrococcus catarrhalis.	Sehr kleine Kurzstäbchen mit abgerundeten Ecken.	Dickerer Typus (?)	Agglutinationsversuch fehlt.
11	G. Zöllner	Sputum. Viele Leukocyten, Plattenepithelien, Hefezellen, Streptokokken, Staphylokokken, influenzaähnliche Stäbchen, vielfach in fischzugähnlicher Anordnung. (Bordet-Typus?)	Tautropfenähnliche gelbliche Kolonien, influenzaähnliche gramnegative Stäbchen. Einzelne Pneumokokken und Staphylokokkenkolonien.	Tautropfenähnlich im durchscheinendem Licht bläulich aussehende Kolonien, influenzaähnliche gramnegative Stäbchen. Staphylokokken- und Streptokokkenkolonien.	Kleine dicke und oval geformte Kurzstäbchen.	Dickerer Typus.	Agglutinationsversuch fehlt.
12	K. Griebisch	Exsudat aus der pneumon. Lunge (bei Sektion). Leukocyten, Alveolarepithelien, rote Blutkörperchen, Pneumokokken, viel influenzaähnliche Stäbchen zum Teil in großen Haufen, zum Teil in den Zellen liegend. (Bordet-Typus?)	Zahlreiche, meist dichtgedrängt stehende, kleine tautropfenähnliche gelbliche Kolonien, influenzaähnliche gramnegative Stäbchen. Reinkultur.	Tautropfenähnlich bei durchscheinendem Licht bläulich aussehende Kolonien, influenzaähnliche gramnegative Stäbchen. Staphylokokkenkolon.	Dicke und oval geformte Kurzstäbchen.	Dickerer Typus.	Agglutinationsversuch fehlt.

## Diejenigen Fälle, in denen influenzaähnliche Stäbchen nicht kultivierbar waren.

No.	Name des Falles	Untersuchungsmaterial Originalpräparat	Wachstum	
			Bordetscher Agar	Taubenblutagar
13	M. Tänza	Sputum. Leukocyten, Plattenepithelien, Pneumokokken, Streptokokken, spärliche influenzaähnliche gramnegative Stäbchen (Bordet-Typus?)	Keine influenzaähnlichen Kolonien. Kolonien d. Streptokokken, Pneumokokken u. Sarcinen.	Keine influenzaähnlichen Kolonien. Kolonien d. Streptokokken u. Sarcinen.
14	A. Tänza	Sputum. Leukocyten, Plattenepithelien, Flimmerepithelien, Kettenkokken, Pneumokokken, wenig influenzaähnliche gramnegative Stäbchen (Bordet-Typus?)	Keine influenzaähnlichen Kolonien. Kolonien d. Streptokokken u. Pneumokokken.	Keine influenzaähnlichen Kolonien. Kolonien d. Streptokokken u. große grampositive Kokken.
15	K. Hahn	Sputum wie No. 14 (Bordet-Typus?)	Wie No. 14.	Keine influenzaähnlichen Kolonien. Kolonien d. Streptokokken u. Pneumokokken.
16	H. Weiss	Sputum. Leukocyten, Plattenepithelien, Diplokokken, Staphylokokken, influenzaähnliche gramnegative Stäbchen in geringerer Zahl (Bordet-Typus?)	Keine influenzaähnlichen Kolonien. Staphylokokken und Diplokokkenkolonien.	Keine influenzaähnlichen Kolonien. Kolonien der Staphylokokken, Diplokokken und Micrococc. catarrhalis.

bacillen, während die anderen Bakterien, wie schon hervorgehoben, geringe Abweichungen erkennen ließen.

Es waren Stäbchen, die etwas kürzer und ein wenig dicker als die Influenzabacillen aussahen, unbeweglich, gramnegativ, mit den gewöhnlichen Anilinfarbstoffen gut färbbar, besonders gut mit 1:20 verdünntem Karbolfuchsin; die Form war, wie bereits im Originalpräparate konstatiert werden konnte, etwas oval, die beiden Enden durch die Farbstoffe meist elektiv färbbar. Scheinfädenbildung, ähnlich wie sie bei Influenza häufig zu konstatieren ist, kam bei diesen Bacillen zumeist nicht vor.

Wir sehen, daß hier zwei, wenn auch nur wenig voneinander unterscheidbare Bacillenformen gefunden wurden. Ob diese morphologischen Unterschiede tatsächlich auf zwei voneinander verschiedene Bakterienarten zurückzuführen sind, kann nur entschieden werden, wenn es gelingen sollte, eine Differenzierung der beiden gefundenen Formen durch serologische Methoden zu erzielen.

Nach den Untersuchungen von Delius und Kolle<sup>1)</sup>, Cantani<sup>2)</sup> und anderen Autoren, sowie nach meinen eigenen Erfahrungen gelingt es in Tierexperimenten nicht, eine Immunität gegen Influenzabacillen zu erzielen, und auch eine Anreicherung von bakteriziden Schutzstoffen gegen Influenzabacillen im Serum ist bisher durch Immunisierung nicht einwandfrei nachgewiesen worden. Ich mußte mich daher bei meinen

1) Zeitschr. f. Hyg. Bd. 24. 1897.

2) Zeitschr. f. Hyg. Bd. 42. 1903.

Differenzierungsversuchen auf die Methoden der Agglutination und der Komplementablenkung beschränken.

In den Kreis meiner Versuche habe ich die hier beschriebenen von mir bei Keuchhusten gefundenen Bacillen, sichere Influenzakulturen, zwei von Herrn Professor Bordet in dankenswerter Weise mir zugeschickte Pertussis-Stämme, ferner hämoglobinophile Bacillen, welche Cohen<sup>1)</sup> bei Meningitiskranken gefunden und mir gütigst zur Verfügung gestellt hat, außerdem den von Friedberger entdeckten hämoglobinophilen Hundebacillus [*Bacillus haemoglobinophilus canis*<sup>2)</sup>], den ich aus Präputialsekreten von Hunden selbst gewonnen habe, einbezogen, da mir daran gelegen war, festzustellen, ob spezifische Unterschiede zwischen den einzelnen Bacillenarten vorliegen.

Was die Herstellung von Immunseris anlangt, so habe ich zunächst zur Immunisierung verwandt eine meiner Kulturen, welche die feineren Stäbchen zeigte, sowie eine meiner Kulturen, welche die dickeren Stäbchen aufwies, ferner die zwei von Herrn Professor Bordet stammenden Pertussis-Stämme (deren einer immer auf Bordet-Agar weiter gezüchtet war, deren anderer bereits auf gewöhnlichem Agar gezüchtet ankam und auf dem gleichen Nährboden weitergezüchtet wurde) und eine von Herrn Geheimrat Pfeiffer herrührende echte Influenzabacillenkultur.

Es wurden die Kulturen in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, möglichst schonend durch halbstündige Erhitzung im Wasserbade bei 55° C abgetötet und in steigenden Dosen Kaninchen intravenös injiziert. Begonnen wurde mit  $\frac{1}{2}$  Oese in 1 ccm Kochsalzlösung, nach je 5 bis 8 Tagen wenn das anfänglich gesunkene Körpergewicht der Versuchstiere wieder zur oder über die Norm gestiegen war, wurde die Dosis um  $\frac{1}{2}$  Oese gesteigert; dies wurde so lange fortgesetzt, bis ein brauchbares Serum bei Probeentnahme konstatiert werden konnte. Meistens war dies bereits nach 3- bis 6-maliger Injektion erreicht. Ich möchte hier bemerken, daß meine Immunisierungsversuche durch den Umstand erschwert und verzögert wurden, daß eine große Zahl der Tiere im Versuche starb. Es hat den Anschein, daß die Kaninchen eine längere Behandlung mit Bordet- und Influenzabacillen sehr schlecht vertragen.

Bei der Vornahme der Agglutinationsversuche stößt man dadurch auf Schwierigkeiten, daß einerseits Bakterienklumpen sowie Nährbodenbestandteile, namentlich Blut, die Homogenität der Bakterienaufschwemmungen stören und daß anderseits in vielen Fällen die Bakterienaufschwemmungen — namentlich bei Influenzabacillen tritt es besonders hervor — Spontanagglutination zeigen; hierdurch wird es unmöglich, den Agglutinationsbefund richtig zu beurteilen.

Die erste Fehlerquelle läßt sich leicht beheben, wenn man die vorhandenen Klümpchen durch leichtes Zentrifugieren entfernt. Größere Schwierigkeiten machte mir die Spontanagglutination. Nachdem ich nach verschiedenen Versuchen, durch Herabsetzung der Kochsalzkonzentration etc. nicht zum Ziele gelangen konnte, habe ich auf Anraten des Herrn Professor Scheller die Bacillenemulsionen folgendermaßen hergestellt und behandelt:

1) Annal. de l'Institut. Pasteur. 1909. No. 4.

2) Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Orig. Bd. 33. 1903.

Von jedem zur Agglutination herangezogenen Stamme werden 7 bis 8 Schrägkulturen in 97 ccm 0,2-proz. Kochsalzlösung aufgeschwemmt; hierzu werden 3 ccm Formalin zugesetzt. Diese Aufschwemmung wird 10 bis 12 Stunden, eventuell auch 24 Stunden im Schüttelapparat stark geschüttelt. Sodann wird das Ganze durch Papierfilter filtriert.

Die Methode erwies sich als brauchbar, indem die Filtrate einerseits homogen waren und spontan nicht agglutinierten, andererseits gut agglutinabel waren. Ja es war nach dieser Methode die Agglutination stärker und deutlicher als nach den sonst geübten Methoden. Ueberdies konnte ich mich von der Haltbarkeit dieser Bacillenemulsionen überzeugen.

Die oben erwähnte, zunächst angestellte Agglutinationsreihe verfolgte den Zweck, die von mir isolierten Stämme zu differenzieren (s. Tab. III).

Es zeigte sich, daß von meinen 9 zu den Agglutinationsversuchen verwandten Stämmen — 3 Stämme waren mir leider vorher eingegangen — 5 durch Bordet-Bacillenserum agglutiniert wurden, durch Influenzaserum nicht, 4 durch Influenzaserum agglutiniert wurden, hingegen nicht durch Bordet-Serum. Es waren dies im ersten Falle die dickeren

Tabelle III.

Das Agglutinationsverhältnis der von den Kranken isolierten influenzaähnlichen Bacillenstämmen.

Bezeichnung +++ bedeutet vollkommene Agglutination, ++ große Flöckchenbildung, + kleine Flöckchenbildung, ± schwache, mit dem unbewaffneten Auge kaum sichtbaren Agglutination.

a) Versuch mit Anti-Bordet-Serum.

Bacillen	Verdünnungen						
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
Isolierte Stämme	E. Scholz	—	—	—	—	—	—
	W. Böhm	++	++	++	+++	±	—
	K. Wolf	++	+	+	++	±	—
	A. Schirma	—	—	—	—	—	—
	L. Kühr	—	—	—	—	—	—
	W. Wolf	++	++	++	+	±	—
	D. Winkler	++	++	++	+	±	—
	H. Hahn	++	++	++	+++	+	—
	R. Schoter	—	—	—	—	—	—
Bordetsche Bacillen	++	++	++	+++	+	±	—
Pfeiffersche „	—	—	—	—	—	—	—

b) Versuch mit Anti-Influenzaserum.

Bacillen	Verdünnungen						
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
Isolierte Stämme	E. Scholz	++	++	++	+++	±	—
	W. Böhm	±	—	—	—	—	—
	K. Wolf	—	—	—	—	—	—
	A. Schirma	+	++	++	++	—	—
	L. Kühr	+	+	++	++	—	—
	W. Wolf	—	—	—	—	—	—
	D. Winkler	—	—	—	—	—	—
	H. Hahn	—	—	—	—	—	—
	R. Schoter	+	+	++	+++	±	—
Bordetsche Bacillen	—	—	—	—	—	—	—
Pfeiffersche „	++	++	++	+++	++	±	—

## c) Versuch mit Anti-Serum (mit E. Scholz-Bacillusstamm erzeugt).

Bacillen		Verdünnungen						
		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
Isolierte Stämme	E. Scholz	++	++	++	++	±	—	—
	W. Böhm	±	—	—	—	—	—	—
	K. Wolf	—	—	—	—	—	—	—
	A. Schirma	++	++	++	+++	+	±	—
	L. Kühr	±	—	—	—	—	—	—
	W. Wolf	—	—	—	—	—	—	—
	D. Winkler	—	—	—	—	—	—	—
	H. Hahn	—	—	—	—	—	—	—
	R. Schoter	+	+	+	+	—	—	—
Bordetsche Bacillen		—	—	—	—	—	—	—
Pfeiffersche „		++	++	++	++	±	—	—

## d) Versuch mit Anti-Serum (mit W. Böhm-Bacillusstamm erzeugt).

Bacillen		Verdünnungen						
		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
Isolierte Stämme	E. Scholz	—	—	—	—	—	—	—
	W. Böhm	++	++	++	++	—	—	—
	K. Wolf	+	+	+	±	—	—	—
	A. Schirma	—	—	—	—	—	—	—
	L. Kühr	—	—	—	—	—	—	—
	W. Wolf	++	+	+	++	—	—	—
	D. Winkler	+	+	+	+	—	—	—
	H. Hahn	++	++	++	++	±	—	—
	R. Schoter	—	—	—	—	—	—	—
Bordetsche Bacillen		++	++	++	++	±	—	—
Pfeiffersche „		—	—	—	—	—	—	—

Bacillen, im zweiten Falle die feineren Stäbchen. Das durch Immunisation mit einem meiner feinen Bacillenstämme gewonnene Serum agglutinierte bis auf den Stamm Kühr alle jene Stämme, welche durch Influenzaserum agglutiniert wurden, nicht aber jene Stämme, welche nur mit Bordet-Serum Agglutination zeigten. Das mit einer Kultur der dickeren Form gewonnene Serum agglutinierte sämtliche mit dem Bordet-Serum agglutinierbaren Patientenstämme, nicht aber jene, welche nur durch Influenzaserum agglutiniert wurden.

Wir sehen einerseits, daß die sich morphologisch, wenn auch nur wenig von Influenza unterscheidenden Patientenstämme nur von Bordet-Serum agglutiniert wurden, jene ganz influenzaähnlichen Stämme, die ich isoliert habe, nur von Influenzaserum; andererseits konnte ich auch mit jeder dieser Bacillenformen Sera erzeugen, welche nur dieselbe Bacillenform spezifisch beeinflusst, nicht aber die andere. Es ist bereits nach diesen Befunden die Wahrscheinlichkeit groß, daß der von Bordet beschriebene Bacillus tatsächlich, wie es auch Bordet angibt, vom Influenzabacillus verschieden ist.

Ein weiterer Beweis für die Richtigkeit der Bordetschen Angabe konnte von mir in meinen Komplementablenkungsversuchen erbracht werden, in denen ich bei zwei von je einer Form gewählten Stämmen spezifische Unterschiede konstatieren konnte (s. Tab. V).

Die bisherigen Untersuchungen sprechen dafür, daß der Keuchhusten keine einheitliche Erkrankung ist, sondern einen Symptomenkomplex von verschiedenartigen Infektionen darstellt. Zum Teil können die Erschei-



nungen hervorgerufen werden durch Diplokokken und Streptokokken etc., zum Teil können hämoglobinophile Bakterien hierfür verantwortlich gemacht werden. Wir sehen aber, daß auch unter den hämoglobinophilen Bakterien, die wir bei Keuchhusten finden, zwei Arten spezifisch voneinander zu unterscheiden sind, von welchen die eine Art der Bordetsche Keuchhustenbacillus ist, die andere Art von Influenzabacillen sich nicht unterscheiden läßt. Es sind dies Resultate, welche nicht überraschen, wenn wir an die analogen Verhältnisse bei Cholera und Influenza denken.

Die weitere Frage, die noch zu erledigen war, betrifft die Unterscheidbarkeit der übrigen hämoglobinophilen Bakterien. Wir sehen aus den Tabellen (IV und V), daß sich auch der Cohensche Bacillus meningitidis cerebrospinalis septicaemicus spezifisch differenzieren läßt von den übrigen hämoglobinophilen Bakterien, sehen aber, daß sich der Hundebacillus Friedberger und der Influenzabacillus weder durch Agglutination, noch durch Komplementablenkung voneinander unterscheiden lassen.

Allerdings muß bemerkt werden, daß die Komplementbindungsversuche nicht so ausgesprochene Resultate ergeben haben wie die Agglutinationsversuche. Cohen und Fitzgerald<sup>1)</sup> haben schon betont — und ich schließe mich ihrer Ansicht durchaus an — daß die mit influenzaähnlichen Bacillen hergestellten Immunsera stärker agglutinierend als komplementbindend wirken und daß auch die Agglutination strenger spezifisch als die Komplementbindung ist.

Wir sehen, daß die hämoglobinophilen Bakterien in verschiedene, voneinander differenzierbare Arten zerfallen, und wir sind nunmehr im stande, die Zweifel an der ätiologischen Bedeutung des Influenzabacillus für die Influenza, welche zum Teil durch den Befund hämoglobinophiler Bacillen, bei allerlei Krankheitsprozessen entstanden waren, für unbegründet zu erklären.

Die Schlußfolgerungen, welche wir aus den eben berichteten Untersuchungen ziehen können, sind folgende:

1) Bei Keuchhustenkranken können wir einerseits hämoglobinophile Bakterien als Krankheitserreger nachweisen, andererseits können bei Abwesenheit derartiger hämoglobinophiler Bakterien in anderen Fällen verschiedene andere Bakterien ätiologisch verantwortlich gemacht werden.

Tabelle IV.

Das Agglutinationsverhältnis der hämoglobinophilen Bakterien.

a) Versuche mit Antiserum Mening. cereb. sept. (Cohensche Bacillen.)

Bacillenarten	Verdünnungen						
	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640
Influenzabacillen	—	—	—	—	—	—	—
Cohensche Bacillen	+++	+++	+++	+++	++	±	—
Bordetsche "	±	±	—	—	—	—	—
Hundebacillus	—	—	—	—	—	—	—
Isolierter Stamm I	—	—	—	—	—	—	—
" " II	—	—	—	—	—	—	—

1) Centralbl. f. Bakteriöl. Abt. I. Orig. Bd. 56. 1910.

## b) Versuche mit Anti-Influenzaserum.

Bacillenarten	Verdünnungen						
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
Influenzabacillen	++	++	++	+++	++	±	—
Cohensche Bacillen	—	—	—	—	—	—	—
Bordetsche "	—	—	—	—	—	—	—
Hundebacillus	++	++	++	+	+	±	—
Isolierter Stamm I	++	++	++	+++	±	—	—
" " II	±	—	—	—	—	—	—

## c) Versuch mit Antiserum (Bordetbacillus).

Bacillenarten	Verdünnungen						
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
Influenzabacillen	—	—	—	—	—	—	—
Cohensche Bacillen	±	±	—	—	—	—	—
Bordetsche "	++	++	++	+++	+	±	—
Hundebacillus	—	—	—	—	—	—	—
Isolierter Stamm I	—	—	—	—	—	—	—
" " II	++	++	++	+++	±	—	—

## d) Versuch mit Antiserum-Hundebacillus.

Bacillenarten	Verdünnungen						
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
Influenzabacillen	+	+	±	—	—	—	—
Cohensche Bacillen	—	—	—	—	—	—	—
Bordetsche "	±	±	—	—	—	—	—
Hundebacillus	+	+	±	—	—	—	—
Isolierter Stamm I	±	±	—	—	—	—	—
" " II	—	—	—	—	—	—	—

## e) Versuch mit Antiserum isolierter Stamm I.

Bacillenarten	Verdünnungen						
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
Influenzabacillen	++	++	++	++	±	—	—
Cohensche Bacillen	+	±	±	—	—	—	—
Bordetsche "	—	—	—	—	—	—	—
Hundebacillus	++	++	+	+	—	—	—
Isolierter Stamm I	++	++	++	++	±	—	—
" " II	±	—	—	—	—	—	—

## f) Versuch mit Antiserum isolierter Stamm II.

Bacillenarten	Verdünnungen						
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
Influenzabacillen	—	—	—	—	—	—	—
Cohensche Bacillen	—	—	—	—	—	—	—
Bordetsche "	++	++	++	+++	±	—	—
Hundebacillus	±	±	—	—	—	—	—
Isolierter Stamm I	—	—	—	—	—	—	—
" " II	++	++	++	++	—	—	—

Tabelle V.

Das Komplementbindungsverhältnis der hämoglobinophilen Bakterien.  
Antikörper + Antigen + Komplement; das Gemisch 4 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen; dann Zusatz des sensibilisierten Blutes (nach der Originalmethode von Bordet und Gengou).

Resultat der Hämolyse mit den einzelnen Bacillenarten											
Antikörper	Antigen	Komplement	Sensibil. Blut	Bac. m. c.-sp. sept.	Influenza-bacillus	Bordetacher Bacillus	Hunde-bacillus	Isolierter Stamm I	Isolierter Stamm II		
Serum-verdünnung 56° inaktiv.	Bakterien-emulsion <sup>1)</sup>	Meerschwein-chenserum	1 Teil hämolyt. Ambozeptor (2-fach lösende Dosis = 1/8 mg), 1 Teil 5-proz. Hammelblut								
			a) Versuch mit Antiserum M. c.-sp. sept. <sup>1)</sup> (Cohenscher Bacillus).								
			1:5 (1 ccm)	0,5 ccm	0,05 ccm	2 ccm	Hemmung	Hemmung	Hemmung	Hemmung	Hemmung
			1:10 (1 " )	0,5 "	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"
			1:20 (1 " )	0,5 "	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"
			1:40 (1 " )	0,5 "	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"
			1:80 (1 " )	0,5 "	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"
			1:160 (1 " )	0,5 "	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"
			1:320 (1 " )	0,5 "	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"
			1:5 (1 ccm)	—	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"
1:10 (1 " )	—	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"			
1:20 (1 " )	—	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"			
b) Versuch mit Antiserum Influenzabacillus.											
1:5 (1 ccm)	0,5 ccm	0,05 ccm	2 ccm	Hemmung	Hemmung	Hemmung	Hemmung	Hemmung	Hemmung		
1:10 (1 " )	0,5 "	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"		
1:20 (1 " )	0,5 "	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"		
1:40 (1 " )	0,5 "	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"		
1:80 (1 " )	0,5 "	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"		
1:160 (1 " )	0,5 "	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"		
1:320 (1 " )	0,5 "	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"		
1:5 (1 ccm)	—	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"		
1:10 (1 " )	—	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"		
1:20 (1 " )	—	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"		

1) M. c.-sp. sept. = Mening. cerebrospinal. septicaemic. 2) Nach der Bordet-Gengouschen Methodik wurden 24-stündige Blut-  
agarkulturen mit einer Menge physiologischer Kochsalzlösung — bei einer gut gewachsenen Kultur 8—10 ccm Kochsalzlösung — abgeschwemmt,  
derart, daß eine ziemlich konzentrierte Bakterienemulsion entsteht.

Antikörper	Antigen	Komplement	Sensibil. Blut	Resultat der Hämolyse mit den einzelnen Bacillenarten					
Serum- verdünnung 56° inaktiv	Bakterien- emulsion	Meer- schweinchen- serum	1 Teil hämolyt. Ambozeptor	Bac. m. c.-sp. sept.	Influenza- bacillus	Bordetscher Bacillus	Hunde- bacillus	Isolierter Stamm I	Isolierter Stamm II
			(2-fach lösende Dosis = $\frac{1}{3}$ mg) 1 Teil 5-proz. Hammelblut						

## c) Versuch mit Antiserum Bordetscher Bacillus.

1: 5 (1 ccm)	0,5 ccm	0,05	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse
1: 10 (1 " )	0,5 "	0,05	"	"	"	"	"	"	"
1: 20 (1 " )	0,5 "	0,05	"	"	"	"	"	"	"
1: 40 (1 " )	0,5 "	0,05	"	"	"	"	"	"	"
1: 80 (1 " )	0,5 "	0,05	"	"	"	"	"	"	"
1: 160 (1 " )	0,5 "	0,05	"	"	"	"	"	"	"
1: 320 (1 " )	0,5 "	0,05	"	"	"	"	"	"	"
1: 5 (1 " )	—	0,05	"	"	"	"	"	"	"
1: 10 (1 " )	—	0,05	"	"	"	"	"	"	"
1: 20 (1 " )	—	0,05	"	"	"	"	"	"	"

## d) Versuche mit Antiserum Hundebacillus.

1: 5 (1 ccm)	0,5 ccm	0,05	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse
1: 10 (1 " )	0,5 "	0,05	"	"	"	"	"	"	"
1: 20 (1 " )	0,5 "	0,05	"	"	"	"	"	"	"
1: 40 (1 " )	0,5 "	0,05	"	"	"	"	"	"	"
1: 80 (1 " )	0,5 "	0,05	"	"	"	"	"	"	"
1: 160 (1 " )	0,5 "	0,05	"	"	"	"	"	"	"
1: 320 (1 " )	0,5 "	0,05	"	"	"	"	"	"	"
1: 10 (1 " )	—	0,05	"	"	"	"	"	"	"
1: 20 (1 " )	—	0,05	"	"	"	"	"	"	"
1: 40 (1 " )	—	0,05	"	"	"	"	"	"	"

Antikörper		Antigen	Komplement	Sensibil. Blut		Resultat der Hämolyse mit den einzelnen Bacillenarten					
Serum- verdünnung 56° inaktiv.		Bakterien- emulsion	Meerschwein- chenserum	1 Teil hämolyt. Ambozeptor (2-fach-lösende Dosis = 1/8 mg), 1 Teil 5-proz. Hammelblut		Bac. m. c.-sp. sept.	Influenza- bacillus	Bordetscher Bacillus	Hunde- bacillus	Isolierter Stamm I	Isolierter Stamm II
e) Versuch mit Immunsorum, gewonnen mit Stamm I (Scholz).											
1:5	(1 ccm)	0,5 ccm	0,05 ccm	2 ccm	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse
1:10	(1 " )	0,5 "	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"	"
1:20	(1 " )	0,5 "	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"	"
1:40	(1 " )	0,5 "	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"	"
1:80	(1 " )	0,5 "	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"	"
1:160	(1 " )	0,5 "	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"	"
1:320	(1 " )	0,5 "	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"	"
1:10	(1 ccm)	—	0,05 "	2 "	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse
1:20	(1 " )	—	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"	"
1:40	(1 " )	—	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"	"
f) Versuch mit Immunsorum, gewonnen mit Stamm II (Böhm).											
1:5	(1 ccm)	0,5 ccm	0,05 ccm	2 ccm	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse
1:10	(1 " )	0,5 "	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"	"
1:20	(1 " )	0,5 "	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"	"
1:40	(1 " )	0,5 "	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"	"
1:80	(1 " )	0,5 "	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"	"
1:160	(1 " )	0,5 "	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"	"
1:320	(1 " )	0,5 "	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"	"
1:5	(1 ccm)	—	0,05 "	2 "	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse	Hemmung Hämolyse
1:10	(1 " )	—	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"	"
1:20	(1 " )	—	0,05 "	2 "	"	"	"	"	"	"	"

2) Nach unseren Untersuchungen handelt es sich auch bei den Keuchhustenbefunden mit hämoglobinophilen Bakterien um mindestens zwei voneinander scharf unterscheidbare Erreger; der eine von uns nachgewiesene Bacillus deckt sich in seinen morphologischen und immunisatorischen Eigenschaften mit dem Bordetschen Bacillus, der andere verhält sich in allen seinen Eigenschaften wie ein echter Influenza-bacillus.

3) Die Keuchhustenerkrankung würde demnach keine ätiologisch-einheitliche Erkrankung sein, sondern einen Symptomenkomplex darstellen, welcher bei verschiedenen Infektionen vorkommen kann.

4) Die hämoglobinophilen Bakterien zerfallen in eine größere Zahl spezifisch voneinander trennbarer Unterarten.

Zum Schlusse meiner Arbeit sei es mir gestattet, Herrn Geheimrat Prof. R. Pfeiffer für das dieser Arbeit entgegengebrachte lebenswürdige Interesse, sowie die stetige wertvolle Unterstützung während des für mich so angenehm verlaufenen Aufenthaltes im Hygienischen Institute meinen innigsten Dank auszusprechen.

*Nachdruck verboten.*

## Weitere Untersuchungen über die Inokulierbarkeit leprösen Materials in die vordere Augenkammer von Kaninchen<sup>1)</sup>.

[Aus dem Institut für Hygiene der Kgl. Universität Neapel  
(Direktor: Prof. V. De Giaksa).]

### III. Mitteilung.

Von Dr. **Rodolfo Stanziale**, Dozent für Geschlechtskrankheiten in Neapel.

Mit 5 Tafeln.

In einer meiner früheren Arbeit<sup>2)</sup> über denselben Gegenstand habe ich die Resultate mitgeteilt, welche ich bei der Verimpfung leprösen Materials in die Augen mehrerer Kaninchen erzielt hatte. Diese Resultate, welche ich auch vor der Italienischen Gesellschaft für Dermatologie und Syphilidologie mitteilte<sup>3)</sup>, und zwar mit Demonstration von mikroskopischen Präparaten, zeigten, daß die Inokulation leprösen Materials in die Hornhaut negativ ausfällt, und daß die Einimpfung von stets bacillenreichem, aus Lepraknotensaft oder aus Aufschwemmungen von Knotenstückchen in physiologischer Kochsalzlösung bestehenden, flüssigen Materials in das subconjunctivale Gewebe und in die Vorderkammer des Auges ebenfalls stets negativ ausfällt.

Die Inokulation von Stückchen von Lepraknoten in die vordere Augenkammer hatte hingegen in mehreren Fällen die Entwicklung von

1) Ins Deutsche übertragen von Dr. med. K. Rühl, Turin.

2) Inoculazioni di materiale leproso nella camera anteriore dell'occhio dei conigli. (Giornale italiano delle malattie venere e della pelle. 1910. Fasc. 5.)

3) XII. Versammlung der Ital. Ges. für Dermatologie und Syphilidologie, Rom, 18.—21. Dez. 1910. (Giorn. ital. delle malattie veneree e della pelle. 1911. Fasc. 1.)



granulomatösen, knötchenartigen Herden sowohl in dem direkt mit dem eingepfunden Stück in Berührung stehenden Regenbogengewebe, wie in der Dicke der Hornhaut, entfernt vom inokulierten Stück und vom Einstichkanal, zur Folge, und in den entstandenen Granulomen wurden zahlreiche Leprabacillen nachgewiesen, welche ohne Zweifel auf eine Vermehrung der spezifischen Lepraerreger in loco zurückzuführen waren.

Auf diesem Wege wurden, abgesehen von denen, die in die Cornea inokuliert wurden, 17 Kaninchen geimpft.

Bei meinen Untersuchungen führte ich auch Serienverimpfungen von Kaninchen auf Kaninchen auf; über dieselben werde ich weiter unten berichten.

\* \* \*

Mit gegenwärtiger Arbeit bezweckte ich die Fortsetzung der soeben erwähnten Untersuchungen; zu gleicher Zeit stellte ich weitere, resp. neue Versuche an, um den Prozeß näher zu erforschen, der auf die Inokulation leprösen Materials in die vordere Kammer der Kaninchenaugen folgt.

Einige meiner diesbezüglichen Untersuchungen und die ersten Resultate, die ich erhielt, wurden bereits zum Gegenstand einer Mitteilung<sup>1)</sup> vor der R. Accademia medico-chirurgica in Neapel, welche von der Demonstration von mikroskopischen Präparaten und von einigen der inokulierten Tiere begleitet war.

Diese zweite Reihe meiner Untersuchungen begann im Dezember 1910 und bezieht sich zum größten Teil auf Material, welches mir in freundlicher Weise von Herrn Prof. Philippson, Palermo, und Herrn Prof. Serra, Cagliari, zugesandt wurde, da ich zu jener Zeit keine Leprafälle zur Verfügung hatte.

Das wie bei meinen früheren Experimenten, aus leprösen Tuberkeln bestehende Material habe ich 19 Kaninchen in die Vorderkammer des Auges nach der in meiner vorigen Arbeit beschriebenen Technik eingepfunden.

Die erste Inokulation geschah bei 5 Kaninchen am 30. Dezember 1910 mit Material aus der Klinik zu Palermo.

Der dortige Assistenzarzt, Herr Dr. Scaduto, gab mir freundlichst an, das Material bestände aus zwei Lepraknoten, die in floridem Zustande aus der radiocarpalen Gegend eines 30-jährigen, an tuberöser Lepra kranken Mannes exzidiert worden waren, welcher seit dem Alter von 13 Jahren in New York gewohnt hatte. Die Krankheit hatte sich vor 8 Jahren entwickelt, hatte am linken Auge begonnen, und Patient war dadurch gezwungen worden, nach seinem Vaterland zurückzukehren. Gegenwärtig waren das Gesicht und der Hals in diffuser und konfluierender, die oberen Gliedmaßen weniger und die Unterextremitäten spärlich befallen. Patient ist infolge diffuser Leprome am Augapfel blind geworden.

Weitere Inokulationen wurden am 9. und 10. März bei weiteren 6 Kaninchen und am 3. April bei 3 Kaninchen ausgeführt.

Von den ersten 5 inokulierten Kaninchen — die Resultate habe ich vor der Kgl. Akademie mitgeteilt — starb 1 nach 54 Tagen, während

1) Ulteriori ricerche sulle inoculazioni di materiale leproso nella camera anteriore dell'occhio dei conigli. (Atti della R. Accad. medico-chir. di Napoli. 1911. No. 1.)

die übrigen 4 überlebten; 2 von diesen benutzte ich zu weiteren Verimpfungen von Kaninchen auf Kaninchen.

Die 6 im März teils mit Material aus Cagliari und teils mit neuem aus Palermo erhaltenem Inokulierten sind, ebenso wie die 3 im April Geimpften, bei welchen ich Material aus einer Patientin aus meiner privaten Praxis benutzte, noch am Leben.

Mein Versuchsmaterial umfaßt also im ganzen 14 Kaninchen, über die ich im folgenden ausführlich berichten werde:

Kaninchen I (inokuliert am 30. Dezember 1910).

Unmittelbar nach der Inokulation entwickelten sich die gewöhnlichen Entzündungserscheinungen; nach 30 Tagen begann eine Vergrößerung des eingeimpften leprösen Stückes, begleitet von einer Hyperämie der Iris und einer Entstellung der Pupille. Im Laufe weiterer 20 Tage hatte sich das Stück auf das Doppelte vergrößert, und man beobachtete eine ausgesprochene Vaskularisation, bestehend aus äußerst dünnen Blutgefäßen, welche, von der Regenbogenhaut ausgehend, dazu neigten, das Leprastück zu umgeben. Am 50. Tage nach der Inokulation wurde die Wassermannsche Reaktion ausgeführt, und dieselbe fiel positiv aus.

Das Tier starb am 54. Tage. Aus der Autopsie ergaben sich die gewöhnlichen Zeichen der allgemeinen Intoxikationen.

Die Untersuchung des inokulierten Auges, welches enukleiert wurde, ergab folgenden Befund:

Der äußere Sektor der Iris, entsprechend dem horizontalen Durchmesser, war durch einen rosiggelben Knoten eingenommen, dessen Oberfläche von feinsten Blutgefäßen durchzogen war. Dieser Knoten erstreckte sich in horizontaler Richtung von der etwas entstellten Pupille bis zu der äußersten Peripherie der Iris; in vertikaler Richtung zeigte er eine nur wenig geringere Ausdehnung. Bei genauerer Beobachtung mit einer Vergrößerungslupe sah man, daß der Knoten in der Tiefe mit der unterliegenden Iris zusammengewachsen war, so daß man bei Beobachtung in schräger Richtung auch in der Gegend der Hinteroberfläche der Iris einen gelblichen Reflex derselben sah.

Der übrige Teil der Regenbogenhaut erschien, ebenso wie die übrigen Gewebe des Auges, normal. Der enukleierte Augapfel wurde in absolutem Alkohol fixiert, um die Schnitte auch der Differentialfärbung nach dem von Unna für die Unterscheidung der toten von den lebenden Bacillen vorgeschlagenen Verfahren unterziehen zu können. Einige Schnitte wurden, zwecks histologischer Untersuchung, mit Hämatoxylin und Eosin oder mit Hämatoxylin und Orange gefärbt; andere, zwecks bakteriologischer Untersuchung, nach dem Verfahren Ziehl-Neelsens und Unnas gefärbt.

Auch bei Untersuchung der Präparate mit bloßem Auge sieht man deutlich in der äußeren temporalen Zone der Iris eine linsengroße knotige Neubildung, welche die ganze Vorderkammer des Auges einnimmt und sich bis zur hinteren Oberfläche der Hornhaut ausdehnt; in der Tat ist zwischen dieser und dem iridocornealen Winkel der entsprechenden Seite ein winzig kleiner Raum frei geblieben.

Wenn man die Präparate unter geringer Vergrößerung untersucht, so sieht man deutlich, daß sich die in der Augenvorderkammer enthaltene Masse an ihrer Ansatzbasis mit dem Irisgewebe fortsetzt; wenn man die periphere Grenze der Masse näher besichtigt, sieht man deutlich, wie dieselbe direkt in das Stroma der Regenbogenhaut übergeht; die etwas pigmentierten vorderen Schichten dieser letzteren biegen

sich nach vorne um, als ob sie die neugebildete Masse umfassen wollten. Medialwärts erreicht das Knötchen den Sphinkter und den Rand der Pupille, und ist nicht sehr scharf abgegrenzt.

Diese Neubildung zeigt in den einzelnen Teilen eine verschiedene Struktur.

Im Zentrum erscheint sie feinkörnig, in unregelmäßige, mehr oder minder weite Zonen, mit dünnen Spalten, eingeteilt; an der Peripherie beobachtet man hingegen größere und weniger dicht zusammengruppierte Elemente.

Im Zentrum der neugebildeten Masse beobachtet man Streifen, welche in den mit Orange gefärbten Präparaten gelblich, in den mit Eosin gefärbten rosig erscheinen. Diese Streifen sind von der fein granulösen Masse umgeben, und sind aus einem kompakten Gewebe zusammengesetzt, in welchem man mit einer gewissen Regelmäßigkeit reihenweise angeordnete, längliche Kerne sieht (Taf. II, Fig. 2). An einigen anderen Stellen beobachtet man eine deutlich abgegrenzte Zone, welche eine gelbliche Farbe angenommen hat, verschieden von derjenigen der umgebenden körnigen Masse. Diese Zone hat keine definierbare Struktur; während eine Art gelbfarbenedes Grundstroma mit einzelnen Resten von Blutgefäßen zu bestehen scheint, beobachtet man kurze Stränge von kleinen, schwach gefärbten, areolenweise angeordneten Elementen.

Gegen die vordere Grenze der Hauptmasse, in der Nähe der hinteren Oberfläche der Hornhaut, beobachtet man in fast allen Präparaten einen ebenfalls von feinkörnigem Gewebe umgebenen langen Streifen von gelbgefärbtem Gewebe, welcher dieselben Charaktere aufweist wie die oben beschriebenen Streifen von kompaktem Gewebe. Diese kompakten gelblichen Streifen und diese infiltrierten Zonen stellen offenbar die von einem granulomatösen neugebildeten Gewebe umgebenen Reste des Zerfalles des eingepfropften leprösen Stückes dar. In der Tat, rings um die zentrale feinkörnige Masse beobachtet man eine kontinuierliche Zone aus Elementen des epitheloiden Typus, während die äußerste Grenze der Ansatzfläche der Masse an die Regenbogenhaut durch eine mächtige kleinzellige Infiltration angezeigt ist, welche über die ganze Ausdehnung des Knötchens die hinteren Schichten der Iris bis zur pigmentierten Auskleidung einnimmt.

Die übrigen Gewebe des Auges zeigen keine Veränderungen; nur die Hornhaut zeigt an ihrem vorderen Teil, entsprechend dem Knötchen, einige kleine in verschiedener Richtung durchtrennte Gefäße und eine mäßige Kleinzelleninfiltration.

Bei der bakteriologischen Untersuchung wurden in den Zellen und außerhalb derselben zahlreiche, vereinzelt stehende oder gruppenweise angeordnete, deutlich gefärbte, über die ganze Ausdehnung der körnigen Masse und längs der tieferen Irisschichten zerstreute Bacillen nachgewiesen.

Ich habe bereits bei meiner Mitteilung in der Kgl. Akademie hervorgehoben, daß in den nach Unna gefärbten Präparaten die Bacillen größtenteils intensiv blau gefärbt waren, während nur an seltenen Stellen einzelne gelb gefärbte Bacillen zu beobachten waren.

Kaninchen II (inokuliert am 30. Dezember 1910).

Nach 40 Tagen von der Inokulation fing das in die Augenvorderkammer eingepflanzte Stück leprösen Gewebes an, sich langsam zu vergrößern und zeigte später die Entwicklung kleiner gelblicher Punkte;

die Iris erschien dunkelfarbig und mit kleinen injizierten Gefäßen versehen, welche nach den eingepfunden Knötchen hin zusammenflossen; die Pupille war deformiert.

Die Vergrößerung des leprösen Stückes, welches im unteren Segment des iridocornealen Winkels gelegen war, nahm fortwährend zu und erreichte ungefähr 3 Monate nach der Inokulation die Größe einer kleinen Erbse; wenig entfernt davon, d. h. am Pupillenrande entwickelte sich inzwischen ein kleines, gelblich-rosiges Knötchen, welches in 2 Wochen die Größe eines Hirsekorns erreichte.

Die 50 Tage nach der Inokulation ausgeführte Wassermannsche Reaktion fiel positiv aus.

Dieses Kaninchen benutzte ich zu Versuchen von Serienverpflanzungen.

Am 6. April, d. h. 97 Tage nach der Einimpfung, enukleierte ich das Auge und impfte das spärliche Material, welches ich aus den kleinen, am Pupillenrande neugebildeten Knötchen gewinnen konnte, in die Augenvorderkammer von zwei weiteren Kaninchen, während der übrige Teil des Augapfels in absolutem Alkohol fixiert und die Schnitte wie die oben erwähnten gefärbt wurden.

Bei Untersuchung unter geringer Vergrößerung beobachtete man, entsprechend der unteren Hälfte der Iris, die Anwesenheit eines großen Knötchens, welches im Zentrum aus einer amorphen, an Kernen äußerst armen, wie zerklüfteten und verschiedene Spalten aufweisenden Masse bestand, die an der Peripherie von einem jungen Infiltrationsgewebe umgeben war, welches größtenteils aus deutlichen epitheloiden Elementen und im übrigen aus Leukocytenansammlungen zusammengesetzt war, welche unregelmäßig zwischen den erwähnten Elementen und besonders gegen die Peripherie der amorphen zentralen Masse und in der äußersten Zone des Knötchens des Irisgewebes zerstreut waren.

Das Granulationsgewebe, welches die genannte Masse gänzlich umgibt, setzt sich mittels eines breiten Pedikels an die Irismembran an, welche sehr verdickt und reichlich mit Elementen infiltriert erscheint, die dasselbe Aussehen haben, wie diejenigen, die die periphere Zone des Knötchens bilden, und mit unregelmäßigen Leukocytenansammlungen, welche die Wände der Irisblutgefäße umgeben und in Form reichlicher Querstreifen sich bis zur hinteren Oberfläche der Regenbogenhaut erstrecken.

Zwischen der zentralen amorphen Masse des Knötchens und dem dieselbe umgebenden Infiltrationsgewebe beobachtet man an verschiedenen Stellen kurze Verbindungsstücke, und an verschiedenen Stellen dieser Zone treten mehr oder minder reichliche Anhäufungen von Leukocyten deutlich hervor. Der übrige Teil der Iris zeigt hier und da Leukocytenansammlungen, besonders in der Umgebung der Blutgefäße, und zwar sowohl in den vorderen wie in den hinteren Schichten.

Der Ciliarkörper und die Sklera zeigen keine bemerkenswerten Veränderungen.

Die Cornea zeigt an verschiedenen Stellen der dem iridalen Knoten entsprechenden Gegend und in den oberflächlichen Schichten einzelne neugebildete Blutgefäße und eine diffuse Infiltration mit eingewanderten Elementen.

Wenn man unter starker Vergrößerung untersucht und die Aufmerksamkeit zuerst auf den beschriebenen Irisknoten wendet, so sieht man, daß die zentrale amorphe Masse, welche offenbar das eingepflanzte

Hautstück darstellt, keine Zeichen ihrer ursprünglichen Struktur mehr erkennen läßt; man beobachtet nur hier, ebenso wie bei dem vorigen Kaninchen, Stellen, die homogener und stärker lichtbrechend sind und an die Hornschicht der Epidermis erinnern. Das Gewebe, welches diese Masse umgibt, besteht, wie bereits erwähnt, vorwiegend aus epitheloiden Elementen, die zu Inseln oder zu kompakten Strängen vereinigt sind, in welche sich, oft sich zu bedeutenden Gruppen ansammelnd, Leukocyten mit großem Kern und äußerst spärlichem Protoplasma eindringen. In den zentralen Teilen dieses Granulationsgewebes sind nur spärliche neugebildete Gefäße vorhanden, während diese an der Peripherie, d. h. in der Gegend, wo die Masse in das Irisgewebe übergeht, zahlreicher vertreten sind.

Die Grenze zwischen der amorphen Masse und dem soeben beschriebenen Granulationsgewebe ist größtenteils durch Leukocytenansammlungen gekennzeichnet; an einzelnen Stellen beobachtet man jedoch auch kurze Massen neugebildeten Bindegewebes, welche in die periphere Portion der amorphen Masse eindringen.

Die Irisgefäße sind von einer reichlichen Hülle aus Leukocyten umgeben, welche in verschiedenem Grade das ganze, stark infiltriert erscheinende Irisstroma durchsetzen.

In den nach Ziehl-Neelsen gefärbten Präparaten beobachtet man zahlreiche meistens gruppenweise vereinigte, deutlich gefärbte, extra- und intracelluläre Bacillen (Taf. III).

In einigen Präparaten sieht man in dem peripheren Teil des Knötchens, entsprechend der Grenze zwischen diesem und der Irismembran, einzelne kleine mit gut gefärbten Bacillen durchsetzte Gefäße, deren Natur schwer zu erkennen ist (Taf. IV).

In den nach Unna gefärbten Präparaten sind die meisten Bacillen, besonders diejenigen, die man im jungen Granulationsgewebe sieht, blau gefärbt.

Kaninchen III und IV (inokuliert am 30. Dezember 1910).

Nach der Entwicklung der gewöhnlichen Entzündungserscheinungen, die ich früher bereits mehrmals beschrieben habe, und die durch das Trauma und das Vorhandensein eines Fremdkörpers bedingt sind, hat das eingepflanzte lepröse Stück fortschreitend an Größe abgenommen, so daß nach 7 Monaten nur noch einzelne kleine, kaum sichtbare Fragmente zurückgeblieben sind. Selbst bei der genauesten Untersuchung sind keine Veränderungen an der Hornhaut, an der Iris und dem Humor aqueus zu sehen.

Die 50 Tage nach der Inokulation ausgeführte Wassermannsche Reaktion fiel bei beiden Kaninchen negativ aus.

Kaninchen V (inokuliert am 30. Dezember 1910).

Dieses Tier zeigte die sonderbarsten und interessantesten Veränderungen.

Das eingepflanzte Lepraknotenstück fing nach 1 Monat an, sich zu vergrößern, und größtenteils mit dem Pupillenrande und mit dem umgebenden unteren Sektor der vorderen Irisoberfläche zu verwachsen.

Es war nach wenig mehr als 1 Monat auf das Doppelte vergrößert. Zu gleicher Zeit entwickelte sich eine reichliche Vaskularisation, welche, von der Iris ausgehend, sich über das erwähnte eingepflanzte lepröse Stück verbreitete. Später (Taf. I, Fig. 1), während das Knötchen wuchs, wurde die Gefäßneubildung, besonders entsprechend dem temporalen oder Schläfensektor der Iris, ausgesprochener. 4 Monate nach

der Inokulation war das eingepflanzte Stück auf das 7—8-fache vergrößert und zeigte eine grau-rosige Farbe.

Das Gefäßnetz, welches man auf seiner Oberfläche verteilt sah, war auf wenige Arborisationen reduziert, und die Gefäßneubildung, welche sich besonders entsprechend dem temporalen Sektor der Iris entwickelt hatte, war inzwischen dünner geworden und ließ eine unterliegende ziegelrote Infiltration der Iris deutlich erscheinen. Diese Neubildung erschien deutlich durch das Zusammenfließen kleiner, benachbarter Knötchen entstanden; auch konnte man an ihrer Peripherie noch einzelne isolierte Knötchen unterscheiden. Außerhalb dieser neugebildeten Masse und von derselben deutlich getrennt sah man weitere, etwa hanfsamengroße Neubildungsherde mit gleichem Aussehen (Taf. I, Fig. 2). Später entwickelten sich noch allmählich im ganzen unteren Quadranten der Iris mehrere andere mehr oder minder kleine Infiltrationen, welche dieselben Charaktere, wie die soeben erwähnten Herde und das klinische Aussehen wahrer und echter granulomatöser Knötchen aufwiesen.

Die 50 Tage nach der Inokulation ausgeführte und nach weiteren 20 Tagen wiederholte Wassermannsche Reaktion fiel deutlich positiv aus.

Am 8. Mai, also 130 Tage nach der Inokulation, wurde das Auge enukleiert. Eine Hälfte des Augapfels wurde in absolutem Alkohol fixiert und histologisch und bakteriologisch untersucht, die andere Hälfte zu Serienpassagen benutzt. Zu diesem Zwecke wurden Stückchen der Knötchen, die sich in der Iris entfernt von dem inokulierten Stück entwickelt hatten, und Stückchen des Irisgewebes, in dem sich diese Knötchen entwickelt hatten, weiteren 4 Kaninchen in die Vorderkammer des Auges eingeimpft.

Die Schnitte wurden, wie gewöhnlich, zwecks histologischer Untersuchung mit Hämatoxylin und Eosin oder mit Hämatoxylin und Orange, oder zwecks Untersuchung der Plasmazellen nach Pappenheim-Unna, oder zwecks bakteriologischer Untersuchung nach Ziehl-Neelsen oder nach Unna gefärbt.

Unter geringer Vergrößerung sieht man, daß die Veränderungen fast ausschließlich die Regenbogenhaut und ihren Processus ciliaris betreffen. Die Cornea, die Sklera, die Chorioidea und die Retina zeigen keine merkbaren Alterationen. Die Iris erscheint hingegen, mit Ausnahme der äußersten Partien, in ihrer ganzen Ausdehnung an beiden Seiten der Schnitte tief verändert. Besonders hinter der Iris, in der hinteren Augenkammer, in direkter Nachbarschaft mit den hinteren Schichten der iridalen Membran beobachtet man eine ziemlich große, an den verschiedenen Stellen mehr oder minder entwickelte Masse granulomatösen Aussehens. Scharf umschriebene Knötchen beobachtet man nicht; man kann aber aus der Art und Weise, in welcher in der genannten Masse die Herde einzelliger Infiltration angeordnet sind, schließen, daß diese Masse durch das Zusammenfließen mehrerer undeutlich abgegrenzter Knötchen entstanden ist. In dieser Masse beobachtet man zahlreiche große Elemente mit reichlichem Protoplasma und kleinem Kern, welche nicht immer deutlich voneinander zu unterscheiden sind, weil sie dazu neigen, zu Gruppen zusammenzuschmelzen; außerdem erscheint ihr Protoplasma wie homogenisiert und durch das Eosin diffus gefärbt. In der Umgebung von mehr oder minder ausgedehnten Ansammlungen solcher großen Elemente beobachtet man hier und da Gruppen von Lymphocyten mit großem, intensiv gefärbtem Kern, welche meistens Blutgefäße umgeben

und, wie bereits erwähnt, fast eine periphere Zone von granulomatösen Knötchen (Taf. V) bilden.

Hier und da beobachtet man auch einzelne Riesenzellen mit wandständigen Kernen. Diese große, der hinteren Irisoberfläche anliegende Masse geht ohne deutliche Grenzen in das Irisstroma über, und nur aus den unregelmäßigen Streifen zerfallenen Pigments, die man beobachtet, kann man die Topographie der hinteren Irisschichten erkennen. Die Regenbogenhaut hat das Aussehen ihrer normalen Struktur fast gänzlich verloren, und besteht mit Ausnahme einer kurzen peripheren Portion, die sehr verdünnt und atrophisch erscheint, im übrigen aus einem Gewebe, welches aus denselben Elementen gebildet ist, wie die granulomatöse Masse in der vorderen Augenkammer. Als letzte Spuren der ursprünglichen Struktur der Iris beobachtet man nur Anhäufungen zerfallenen Pigments, die jedoch bis zu einem gewissen Grade eine an das normale Pigment der hinteren Oberfläche der Iris erinnernde Anordnung zeigen.

Diese Veränderungen sind unzweifelhaft in der einen Irishälfte, und zwar in derjenigen ausgesprochener, welche der äußeren Schläfengegend entspricht, während die andere Hälfte zwar Elemente der beiden Typen enthält, wie man sie in der granulomatösen Masse beobachtet, aber vielmehr die Zeichen einer Sklerose ihres Gewebes mit starker Ausdehnung der Gefäße aufweist.

Die Gegend, welche dem Pupillenfeld entspricht, und welche man im wesentlichen an der Unterbrechung erkennt, welche an dieser Stelle die pigmentierte Bekleidung der hinteren Oberfläche der Iris zeigt, ist durch eine Masse eingenommen, welche dieselben Charaktere aufweist wie diejenige, die in der Hinterkammer des Auges vorhanden ist, und in welche sie übrigens ohne Unterbrechung übergeht.

Nach vorn ragt sie in die Vorderkammer vor und nähert sich mehr als die übrigen Teile der hinteren Oberfläche der Hornhaut.

Eine deutliche Grenze zwischen dieser, dem Knötchen im Pupillenfeld entsprechenden Masse und den benachbarten pupillaren Zonen der Iris ist nicht zu erkennen; im Gegenteil, die das interpupillare Knötchen bildende Masse geht direkt in das benachbarte Irisgewebe über. In ihrer vorderen oder oberflächlichen Portion beobachtet man zahlreiche Blutgefäße und eine gewisse Ansammlung kleiner Infiltrationselemente, welche wie eine etwas unregelmäßige, aus Elementen des epitheloiden Typus zusammengesetzte Bekleidung der zentralen Masse bilden.

Die iridalen Processus ciliares erscheinen in der Portion, welche der am meisten infiltrierten Irispartie entsprechen, von einer reichlichen kleinzelligen Infiltration befallen. Der Ciliarkörper zeigt auch in seiner ganzen Ausdehnung einen ziemlich hohen Grad von kleinzelliger Infiltration.

Unter starker Vergrößerung beobachtet man, daß in Wirklichkeit der größte Teil der Elemente, welche die granulomatöse Masse bilden, die Tendenz haben, in verschiedener Zahl sich gruppenweise zu vereinigen oder zu Schollen zusammenzufießen, welche ein fast homogenes oder leicht trübes Aussehen annehmen, während die blasser gewordenen Kerne sich in den Schollen verschiedenartig und unregelmäßig anordnen; man beobachtet jedoch noch an verschiedenen Stellen isolierte Elemente, welche ganz das Aussehen der epitheloiden Elemente haben; andere ähneln den Plasmazellen und lassen sich in der Tat bei der Färbung nach Pappenheim-Unna als solche erkennen, und sind besonders in der Umgebung der Blutgefäße vermehrt. Zu bemerken ist, daß in den nach Pappen-



heim - Unna gefärbten Schnitten auch die soeben beschriebenen Schollen, welche den Hauptteil der granulomatösen Masse bilden, eine gewisse Tendenz zeigen, sich mit dem Pyronin zu färben, so daß man den Eindruck bekommt, als ob bei der Zusammensetzung der genannten Masse die Plasmazellen eine bedeutende Rolle gespielt und dann eine degenerative Phase durchgemacht hätten, und schließlich in der erwähnten Weise zusammengeschmolzen wären.

Neben diesen Elementen, welche die erwähnten Alterationen erlitten haben, beobachtet man, wie bereits unter geringer Vergrößerung, an verschiedenen Stellen gruppen- oder streifenweise angeordnete Herde kleinzelliger Infiltration zwischen deren Elementen vereinzelt auch Plasmazellen vorkommen.

In den peripheren Zonen der granulomatösen Masse sind zahlreiche, in den zentralen Teilen spärliche Blutgefäße vorhanden; diese sind in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle von Kleinzelleninfiltrationselementen oder von Plasmazellen umgeben.

In den nach Ziehl gefärbten Präparaten beobachtet man in der granulomatösen Infiltrationsmasse zahlreiche deutlich gefärbte, meistens gruppen- oder haufenweise versammelte, jedoch zum Teil auch vereinzelt stehende extra- und intracelluläre Leprabacillen, und zwar besonders in der Vorderkammer des Auges, wo sie bis in die entferntesten Zonen der Iris zu beobachten sind.

In den nach Unna gefärbten Präparaten erscheinen die Bacillen zum größten Teil blau gefärbt: Nur an einzelnen Stellen findet man einzelne gelb gefärbte (Taf. IV, Fig. 2).

Kaninchen 6, 7, 8 (denselben wurden am 9. März Stückchen von leprösen Tuberkeln in die Vorderkammer des Auges eingepflegt, die mir von Herrn Prof. Serra in Cagliari zugesandt wurden und 5 Tage nach der Entnahme in meine Hände gelangten).

Die unmittelbar nach der Inokulation auftretenden Entzündungserscheinungen waren mit denjenigen der vorigen Versuche identisch. Sonst war bis jetzt bei den 3 Tieren das Resultat ein negatives; gegenwärtig ist die Resorption der leprösen Stückchen schon sehr vorgeschritten; bei einem der Tiere sind die Reste des eingepflegten Materials kaum noch sichtbar.

Kaninchen 9, 10, 11 (inokuliert mit Material aus Palermo, 19 Stunden nach der Entnahme). Von Herrn Dr. Scaduto erhielt ich über den Patienten, von welchem die Lepraknoten herstammten, folgende Notizen:

21-jähriger Mann mit Lepra tuberosa anaesthetica. Bei seinen Vorfahren scheinen Fälle von Lepra vorgekommen zu sein. Eine Schwester starb vor 2 Jahren an Lepra. Patient erkrankte vor 4 Jahren, als die Schwester bereits seit 3 Jahren leprakrank war.

Die Affektion war besonders am Gesicht und an den Gliedmaßen, weniger am Rumpf lokalisiert und bestand vorwiegend aus stecknadelkopf- bis haselnußgroßen, isolierten oder zusammenfließenden Knoten. Bei den Kaninchen 9 und 10 fiel die Inokulation gänzlich negativ aus. Bei dem dritten (No. 11) fing 60 Tage nach der Inokulation das eingepflegte Lepraknotenstückchen, welches infolge des Resorptionsprozesses bereits verkleinert war, an, sich zu vergrößern und erreichte im Laufe weiterer 2 Monate die Größe einer Erbse. Dieses Stück hat allmählich eine gelblich-rötliche Farbe angenommen; es haben sich ganz feine Gefäßchen entwickelt, welche, von der Iris ausgehend, sich über das ein-

geimpfte Gewebe und besonders über seine Peripherie in Form eines eleganten Netzes verteilen. An der Irismembran, und zwar entfernt von dem eingeimpften Gewebstück, beobachtet man bereits die Entwicklung mehrerer rötlicher oder ziegelroter knotiger Infiltrate, deren Entwicklung ganz genau an die bei Kaninchen 5 beobachtete erinnert.

Die 90 Tage nach der Inokulation ausgeführte Wassermannsche Reaktion fiel deutlich positiv aus.

Kaninchen 12, 13, 14. Diese wurden am 5. April mit Stückchen eines frischen leprösen Tuberkels inokuliert, welchen ich aus dem Vorderarm eines Patienten mit *Lepa tuberosa anaesthetica* exzidierte.

Die Resultate fielen gänzlich negativ aus. Gegenwärtig (4 Monate nach der Inokulation) sind die eingeimpften Stückchen sehr verkleinert und im Begriff, gänzlich resorbiert zu werden.

### Serienverimpfungen.

Das Versuchsauge des Kaninchens 2 wurde, wie gesagt, enukleiert und die eine Hälfte davon zu histologischen und bakteriologischen Untersuchungen benutzt, während die andere Hälfte zu den Verimpfungen verwendet wurde. Das kleine, am Pupillenrande neugebildete Knötchen wurde am 6. April d. J. 2 Kaninchen in die Augenvorderkammer inokuliert.

Die auf die Einimpfung folgenden Entzündungserscheinungen waren im Vergleich zu den bei den Inokulationen der ersten Reihe beobachteten sehr leichtgradig. Bei einem der beiden Kaninchen fiel die Einimpfung gänzlich negativ aus und das inokulierte Stück wurde im Laufe von 2 Monaten vollständig resorbiert; gegenwärtig beobachtet man auf der Hornhaut nur noch ein kleines Leukom als Folge der cornealen Wunde.

Bei dem anderen Kaninchen fing das in das obere mediale Segment der Regenbogenhaut eingeimpfte Stück nach etwa 50 Tagen an sich zu vergrößern und erreichte im Laufe eines Monats die Größe eines großen Weintraubensamenkornes, wobei es das Aussehen einer grau-rosigen Masse annahm. Später beobachtete man eine allmählich sich steigende Injektion der entsprechenden Ciliargefäße. 3 Monate nach der Inokulation zeigte die bis da in ihrer ganzen Ausdehnung klare und durchscheinende Hornhaut in der Nähe des Limbus und in der Gegend des oberen Endes des vertikalen Meridians eine linsengroße trübe Zone.

Die fast in ihrer ganzen Ausdehnung normal weite Vorderkammer des Auges, deren Inhalt ebenfalls normal, d. h. ganz klar erschien, war im oberen, der Hornhauttrübung entsprechenden Teil durch die in die Iris eingepflanzte knotige Masse eingenommen, welche sich später noch vergrößerte und die sichtbare Grenze des iridocornealen Winkels erreichte.

Später dehnte sich die Masse bis zur hinteren Oberfläche der Hornhaut, an der Stelle, wo diese getrübt war, aus, und bewirkte bei ihrer weiteren Entwicklung eine Ektasie der Hornhaut. Diese Masse hat, wie erwähnt, eine graulich-rötliche Farbe mit kleinen bräunlichen Fleckchen oder Streifen; sie ist in ihrer vorderen Partie ziemlich rund; ihre Ränder sind etwas undeutlich abgegrenzt, in dem die Masse durch kurze Ausläufer aus einem ebenfalls graulichen Gewebe, in welchem ganz feine Blutgefäße verlaufen, mit der Regenbogenhaut verbunden ist. Die ganze Irisoberfläche erscheint mit kleinen graulichen, in verschiedener Zahl und Anordnung, gruppierten Punkten besät, welche jedoch in der mit den erwähnten Knötchen direkt benachbarten Zone zahlreicher vorhanden

sind. Diese kleinen Pünktchen scheinen jedoch nicht über die Irisoberfläche hervorzuragen (Taf. II, Fig. 1).

Die Pupillenöffnung, welche in vertikaler Richtung oval erscheint, zeigt zahlreiche hintere Synechien. Das Pupillenfeld ist durch eine äußerst dünne exsudative Membran eingenommen, auf welcher man ebenfalls kleine grauliche Pünktchen beobachtet.

Gegenwärtig, 3 Monate nach der Inokulation, hat das Knötchen die Größe einer Erbse erreicht und die Hornhaut an der betreffenden Stelle stark emporgedrängt. In dieser Gegend sind die vorderen Ciliargefäße, und zwar auch rings um den Hornhautrand, bedeutend erweitert; von diesen Gefäßen gehen Aestchen aus, welche sich über die Hornhaut erstrecken und, indem sie miteinander anastomosieren, ein weitmaschiges Netzwerk bilden. In der Nähe des erwähnten Knötchens beobachtet man bei genauer Untersuchung ganz kleine, grau-rötliche, von der Hauptmasse deutlich getrennte Miliarknötchen.

Die 75 Tage nach der Einimpfung ausgeführte Wassermannsche Reaktion fiel positiv aus.

#### Weitere Verpflanzung.

Am 8. Mai wurde, wie gesagt, das Versuchsauge des Kaninchens 5 enukleiert, und eine Hälfte davon zur Inokulation weiterer 4 Kaninchen benutzt. Bei drei dieser in die Vorderkammer des Auges inokulierten Tiere fiel der Versuch negativ aus.

Bei dem vierten Kaninchen hatte hingegen das in das obere mediale Segment der Iris eingepflanzte Stück bereits nach 32 Tagen die Größe eines Weizenkorns erreicht, zeigte eine gelblich-rötliche Farbe und nahm den entsprechenden Raum der Vorderkammer ein. Später erreichte seine vordere Oberfläche die hintere Oberfläche der Hornhaut. Die Ränder dieses Knötchens zeigten infolge der Anwesenheit zahlreicher feinsten Blutgefäße eine rötliche Farbe.

Nach weiteren 30 Tagen zeigte die Hornhaut eine leicht diffuse Trübung und zahlreiche, von der oberen stark injizierten Partie des Augapfels ausgehende Gefäße. Der Irisknoten erreichte dann allmählich die Größe einer kleinen Erbse, während sich drei weitere stecknadelkopfgroße Knötchen in der Nähe des Hauptknotens, aber von diesem deutlich getrennt, entwickelten. Die Oberfläche der Iris zeigt eine starke Gefäßinjektion; das Pupillenfeld ist verengt und entstellt und läßt eine dünne exsudative Zone erkennen.

Die 2 Monate nach der Einimpfung ausgeführte Wassermannsche Reaktion fiel positiv aus.

#### Zusammenfassende Betrachtungen.

Wenn wir meine Versuche kurz zusammenfassen wollen, so sehen wir, daß ich im ganzen 31 Kaninchen inokuliert habe, von denen 17 zur ersten und 14 zur zweiten Reihe gehörten.

Von den ersten 17 Kaninchen wurden 12 mit leprösem Material in flüssiger Form inokuliert, und zwar stets mit negativem Resultat. Den übrigen 5 Tieren der ersten Reihe wurden Stücke von frisch exzidierten Lepraknoten in die Vorderkammer des Auges eingepflanzt; in 4 Fällen fiel die Inokulation positiv, in 1 Fall negativ aus.

Den Kaninchen der zweiten Reihe wurden stets Stücke von Lepraknoten in die Vorderkammer des Auges eingepflanzt; nur bei 4 von ihnen (No. 1, 2, 5, 11) fiel der Versuch positiv aus.

Hervorzuheben ist, daß diesen Tieren das aus Palermo stammende Material eingepflegt wurde.

Bei allen übrigen Kaninchen, d. h. No. 3, 4, 9, 10, die mit Material aus Palermo inokuliert wurden, No. 6, 7, 8, denen das Material aus Cagliari eingepflegt wurde, und No. 12, 13, 14, zu deren Inokulation das Material von einer Patientin aus meiner privaten Praxis geliefert wurde, fiel das Experiment negativ aus.

Die Technik der Inokulation war stets dieselbe, die Resultate waren hingegen, je nachdem flüssiges oder festes Material benutzt wurde, ganz verschieden.

Im ersten Fall fiel die Inokulation stets negativ aus; die wahrscheinlichen Ursachen dieser negativen Resultate habe ich bereits in meiner ersten Arbeit angeführt.

Von den 19 Inokulationen mit festem Material fielen 8 (= 42 Proz.) positiv aus.

Auf Grund dieser Resultate kann man behaupten, daß die Vorderkammer des Kaninchenauges den besten, und bis heute sogar den einzigen Weg zur Einimpfung des Leprakeimes darstellt.

Damit ist aber nicht gesagt, daß auf diesem Wege nicht auch Mißerfolge möglich sind, wie aus den vor meinen Untersuchungen negativ ausgefallenen Versuchen und aus meinen negativen Resultaten hervorgeht.

Man kann, nach meiner Ansicht, schwerlich alle Umstände feststellen, von welchen das positive Resultat des Versuches abhängt. Ich habe bereits betont, daß der Ausgang der Inokulation von der Natur des verwendeten Materials abhängt, indem z. B. die Einimpfung flüssigen Materials stets negativ ausfällt, während nur mit festem Material ein positives Resultat erzielt werden kann, und zwar desto wahrscheinlicher, je größere Stücke eingepflegt werden.

Ein wichtiger Umstand ist nach meiner Ansicht in dem Zustande des inokulierten leprösen Gewebstückes zu suchen. So habe ich bei allen meinen Versuchen für die Auswahl von leprösen Stücken in floridem Zustande Sorge getragen.

Vielleicht ist auch die Menge der im inokulierten Stück vorhandenen Leprabacillen von Bedeutung; diese Menge ist je nach den einzelnen Lepraknoten und selbst in den verschiedenen Abschnitten eines und desselben Knotens verschieden.

Der Zeitraum, der zwischen der Entnahme des leprösen Materials und der Einimpfung desselben verfließen ist, scheint auch innerhalb gewisser Grenzen einen Einfluß zu haben. Es scheint, als ob man die besten Resultate erhielte, wenn man den Lepraknoten unmittelbar nach der Exzidierung inokuliert. So fielen bei meiner ersten Reihe von Versuchen von 5 Inokulationen frischen Materials 4 positiv aus, und bezüglich der 5., negativ ausgefallenen (No. 1), ist zu bemerken, daß ein sehr kleines Stück eingepflegt wurde.

Die positiven Resultate, die ich mit dem Material aus Palermo erzielte, welches 18—19 Stunden nach der Entnahme in meine Hände gelangte, zeigen, wie lange die Infektionsfähigkeit der Stücke dauern kann, und sprechen für die außergewöhnliche Widerstandsfähigkeit des Leprabacillus.

Die unmittelbar auf die Inokulation folgenden Erscheinungen waren bei allen Versuchen dieselben, und bestanden aus gewöhnlichen Entzündungserscheinungen, welche auf das operative Trauma und auf die

Anwesenheit eines Fremdkörpers in der Augenvorderkammer zurückzuführen waren.

Das Sichvergrößern des eingepfunden Stückes unmittelbar nach der Inokulation ist auf von dem Angehen der Infektion unabhängige Umstände zurückzuführen und hängt mit der Durchtränkung des eingepfunden Stückes mit Humor aqueus und mit einer reaktiven Exsudation von seiten der Iris zusammen, was aus dem Exsudatwölkchen hervorgeht, welches das eingepfundene Stück umhüllt. Auf diese entzündlich reaktive, von einem Turgor des leprösen Gewebstückes begleitete Phase folgt allmählich eine regressive Phase, und besonders eine Verkleinerung resp. Resorption des eingepfunden Stückes, welche, wenn der Versuch negativ ausfällt, bis zum gänzlichen Verschwinden des Stückes führt, oder diese Resorption hört nach einem gewissen Zeitraum, der zwischen 30 und 60 Tagen schwankt und den man als eine subkutane Inkubation deuten kann, auf und das lepröse Stück fängt an, allmählich an Volumen zuzunehmen.

Später beobachtet man, zu gleicher Zeit mit dem Wachstum des eingepfunden leprösen Gewebstückes, das Auftreten von graulichen oder grau-rosigen, knotigen Pünktchen auf dem inokulierten Stück oder in seiner Nachbarschaft.

Nach kurzem beobachtet man auf der Irisoberfläche die Entwicklung von Blutgefäßen, und zwar besonders in der Umgebung und an den Rändern der eingepfunden Masse, über welche sie sich ausstrecken.

Inzwischen schreitet die Vergrößerung des Knotens langsam fort, so daß dieser 3—4 Monate nach der Inokulation um das 7—8-fache vergrößert ist, wobei er eine graue oder gelblich-rosige Farbe annimmt.

Das reichliche Gefäßnetz des Knotens fällt dann ebenso wie die Vaskularisation der Iris einer Rarefaktion anheim und es kommen ziegelrote, von der eingepfunden Masse deutlich getrennte Infiltrate der Iris zum Vorschein, welche bei ihrer progressiven Entwicklung miteinander zusammenschmelzen und mehr oder minder entwickelte Neoplasien bilden, an deren Peripherie stets noch isolierte Knötchen sichtbar sind.

Später entwickeln sich noch, deutlich getrennt, weitere kleine Neubildungsherde mit demselben Aussehen, welche man dann mehr oder minder zahlreich auf dem betreffenden Quadranten der Iris zerstreut findet (Kaninchen 5 und 11 der zweiten Reihe).

Die eingepfundene Masse erreicht inzwischen infolge ihrer enormen Entwicklung die hintere Oberfläche der Hornhaut, in welcher sich nach kurzer Zeit deutliche Alterationen entwickeln, charakterisiert durch eine mehr oder minder ausgebreitete Trübung und eine deutliche Blutgefäßneubildung.

Später kommen auch an Stellen, die von der dem inokulierten Knoten entsprechenden Zone entfernt sind, deutlich voneinander getrennte Hornhauttrübungsherde zum Vorschein (Kaninchen 4 der ersten Reihe).

Die Hornhaut wird gespannt und ektatisch (Kaninchen 3 und 5 der ersten Reihe und 5 der zweiten) und kann sich auch ulzerieren, in welchem Falle es zu einem Vorfall der Regenbogenhaut kommt. Dies geschieht jedoch selten; ich beobachtete dies Ereignis nur einmal (Kaninchen 3 der ersten Reihe).

Das inokulierte Kaninchen kann kürzere Zeit (54 Tage, Kaninchen 1 der zweiten Reihe) oder längere Zeit (94 Tage, Kaninchen 5 der ersten Reihe) nach der Inokulation sterben und zeigt bei der Obduktion die gewöhnlichen Erscheinungen der Allgemeinintoxikation.

Der granulomatöse Neubildungsprozeß beginnt, wie aus dem histologischen Befunde deutlich hervorgeht, entsprechend den Resten oder Fetzen des eingepflanzten leprösen Gewebstückes, welches in deutlicher Resorption begriffen ist.

Die wichtigste Tatsache ist die Entwicklung von Herden entfernt vom eingepfundenen Stück, welche durch die direkte Untersuchung und durch den histologischen und bakteriologischen Befund unzweifelhaft bewiesen ist. Auf diese Befunde will ich hier nicht mehr näher eingehen; ich habe dieselben in meinen vorigen Arbeiten ausführlich besprochen und dabei die spezifische Natur der neugebildeten Granulome in bezug auf ihre histologische Zusammensetzung und auf die Anwesenheit von Leprakeimen nachgewiesen. Diese Keime sind, ihren tinktoriellen Eigenschaften, ihrer Anordnung, ihrem Aussehen, ihrem häufigen Vorkommen innerhalb der Zellen der Granulome nach unzweifelhaft als Leprabacillen, die infolge eines Vermehrungsprozesses entstanden sind, zu deuten. Infolgedessen hat der gegen meine Resultate erhobene Einwand, es könne sich bei den entfernt vom inokulierten leprösen Gewebstück vorgefundenen Bacillen um Keime handeln, die infolge des Zerfalles und der nekrotischen Kolliquation des eingepfundenen Stückes frei geworden sind und im toten Zustande von den Saftströmen fortgeschleppt worden sind, keinen Wert. Gegen diese Vermutung und für die Vitalität der Bacillen spricht ferner in unzweifelhafter Weise der Umstand, daß solche Bacillen in den Granulomen gefunden wurden, die sich in der Dicke der Hornhaut, also entfernt vom eingepfunden leprösen Gewebstück und entfernt von dem bei der Inokulation erzeugten Einstichkanal, entwickelt hatten.

In der Tat, es ist aus mehreren Experimenten aus der Augenphysiologie bekannt, daß, wenn eine Aufschwemmung von chinesischer Tusche, oder von Karminkörnchen oder von sonstigen Fremdsubstanzen oder von toten Bacillen in die vordere Augenkammer eingepfunden wird, diese auf zwei Wege den Augapfel verlassen können, nämlich entweder durch den sclerocornealen Winkel (Schlemmscher Kanal) oder durch die Basis der Iris (Circulus vasculosus major), daß sie aber in keinem Fall, bei unversehrter Descemet'scher Membran, in der Dicke der Hornhaut angetroffen werden können, deren Lymphstrom einen zentrifugalen Verlauf hat.

Die Wassermann'sche Reaktion fiel nur in den Fällen positiv aus, wo die Inokulation ein positives Resultat gehabt hatte. Bei der heutigen Verschiedenheit der Meinungen über die Bedeutung dieser Reaktion bei Infektionsprozessen kann man schwerlich sagen, welcher Wert ihrem positiven Ausgang bei meinen Versuchen beizulegen ist.

Ich habe einige Kontrollversuche angestellt und die Wassermann'sche Reaktion bei gesunden Kaninchen ausgeführt; hier fiel sie natürlich negativ aus. Ich impfte dann diesen Kaninchen Lepraknoten in das Peritoneum und prüfte nach einem Monat die Tiere auf Wassermann und wiederholte die Reaktion mehrmals mit verschiedenen Zeiträumen. Das Resultat war stets negativ. Daraus glaube ich schließen zu dürfen, daß bei den mit Erfolg in das Auge inokulierten Kaninchen die Wassermann'sche Reaktion ohne Zweifel eine gewisse Bedeutung hat.

Ich habe auch Kontrollversuche anderer Art ausgeführt, d. h. Kaninchenstücke steriler Haut oder Stücke von Lepraknoten in die Augenvorderkammer eingepfunden, deren Bacillen ich vorher durch Erwärmen

getötet hatte. Abgesehen von den unmittelbaren postoperativen Reaktionserscheinungen konnte ich in keinem Fall irgendwelche Erscheinung beobachten, die auch nur bei weitem an die oben beschriebenen Alterationen hätte erinnern können. Wenn man durch Erwärmen sterilisierte lepröse Gewebstücke einimpft, werden dieselben innerhalb einer je nach der Größe des inokulierten Stückes verschiedenen Zeit allmählich resorbiert.

Der auf die Einimpfung gesunder Haut folgende Prozeß spielt sich viel langsamer ab. Bei den Kaninchen, die vor 5 Monaten in dieser Weise inokuliert wurden, sind heute noch in der Vorderkammer des Auges Hautstückchen sichtbar; diese haben an Größe abgenommen und zeigen eine grau-gelbliche Farbe, welche den Eindruck machen, als wären die Stücke einem Entartungsprozeß anheim gefallen. Ob dies tatsächlich der Fall ist, wird uns die histologische Untersuchung sagen. Der Humor aqueus ist ganz klar; die Hornhaut und die Iris zeigen keine Veränderungen.

\*            \*            \*

Verpflanzungen von Kaninchen auf Kaninchen habe ich sowohl mit Kaninchen der ersten wie der zweiten Reihe ausgeführt.

Aus der ersten Reihe habe ich nur das Kaninchen No. 4 benutzt, indem ich kleine, aus den veränderten Zonen entnommene Stücke der Hornhaut 2 weiteren Kaninchen in die Augenvorderkammer inokulierte. Die Resultate waren negativ, was vielleicht auf die spärliche Menge Material zurückzuführen ist, über die ich verfügte.

Aus der zweiten Reihe habe ich 2 Kaninchen (No. 2 und 5) verwendet, und von dem einen derselben auf 2, von dem anderen auf 4 weitere Kaninchen verimpft. Wie bereits erwähnt, fiel nur in 2 Fällen die Inokulation positiv aus.

Aus der Tab. II ist der Zustand eines dieser Kaninchen 3 Monate nach der Inokulation ersichtlich.

Ich behalte mir vor, den Prozeß weiter zu verfolgen, histologische Untersuchungen auszuführen und Verimpfungen dritter Passage zu versuchen. Die Resultate werde ich seiner Zeit mitteilen.

Neapel, Juli 1911.

#### Erklärung der Abbildungen.

##### Tafel I.

Fig. 1. Auge des Kaninchens No. 5, 62 Tage nach der Inokulation.

Fig. 2. Dasselbe, 4 Monate nach der Inokulation.

##### Tafel II.

Fig. 1. Serienverimpfung von Kaninchen auf Kaninchen. Auge eines Kaninchens, dem das dem Kaninchen No. 2 entnommene Material eingeimpft wurde, 3 Monate nach der Inokulation.

Fig. 2. Noduläre granulomatöse Neubildung an der Iris, welche die ganze Vorderkammer einnimmt und sich rings um den Rest des eingeimpften leprösen Gewebstückes entwickelt hat (Anfangsphase des Prozesses; Kaninchen No. 1). Koristka. Ok. 2, Obj. 3.

##### Tafel III.

Kaninchen No. 2. Großer Knoten an der Iris, der die ganze Vorderkammer einnimmt und sich bis zur hinteren Oberfläche der Hornhaut erstreckt. Zahlreiche Bacillen, besonders an der Peripherie der granulomatösen Masse (Färbung nach Ziehl-Neelsen). Zeiss, Obj. AA, Ok. 3.



Fig. I

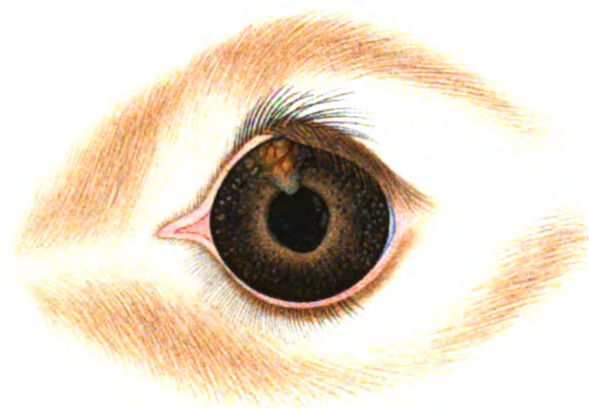


Fig. II

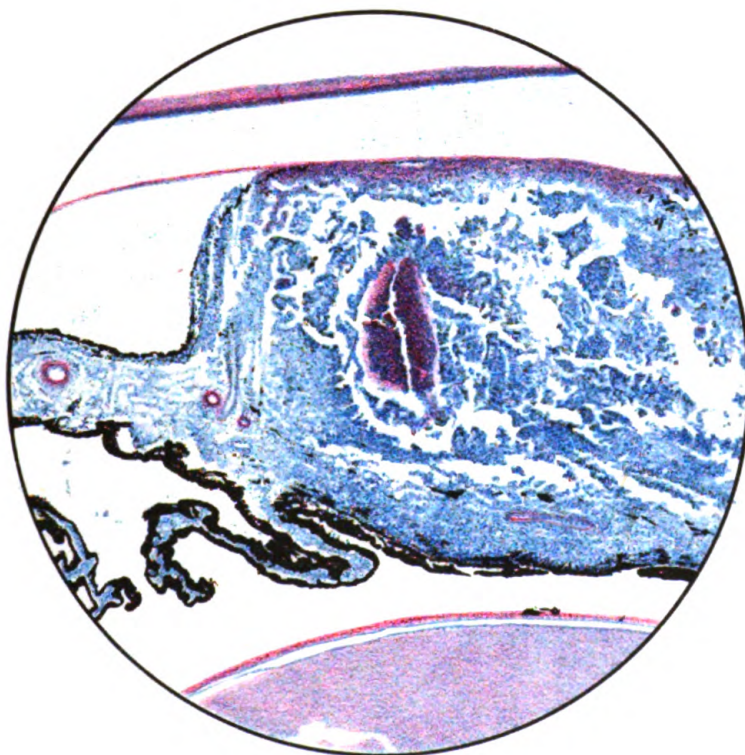




1.

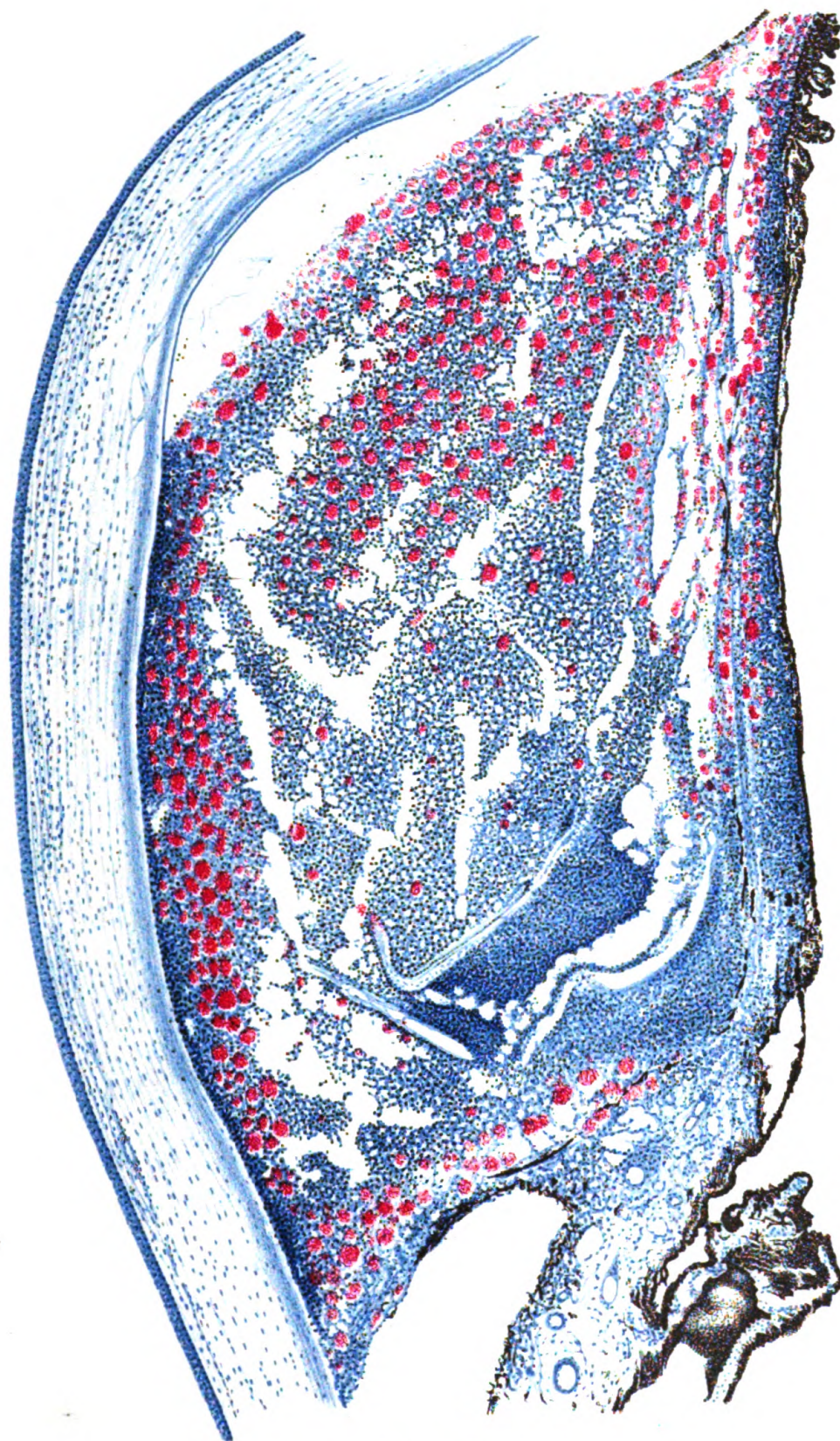


2.







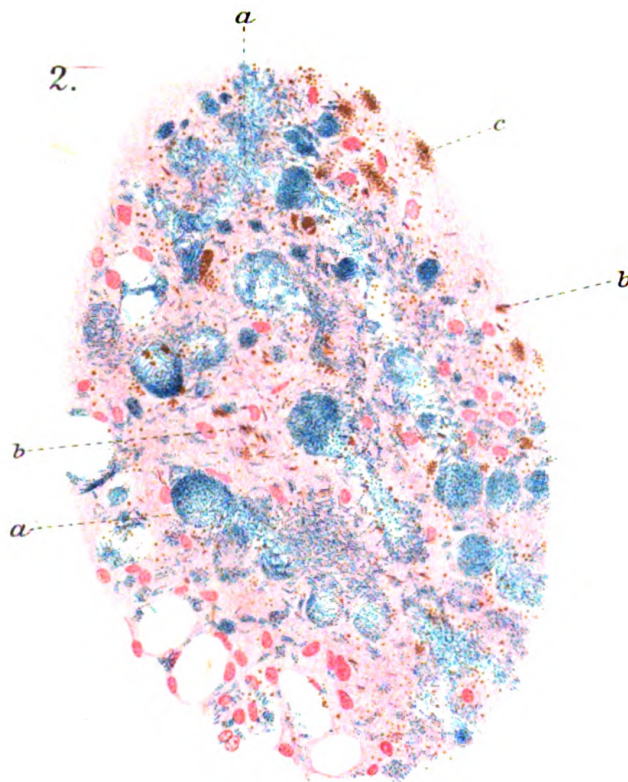
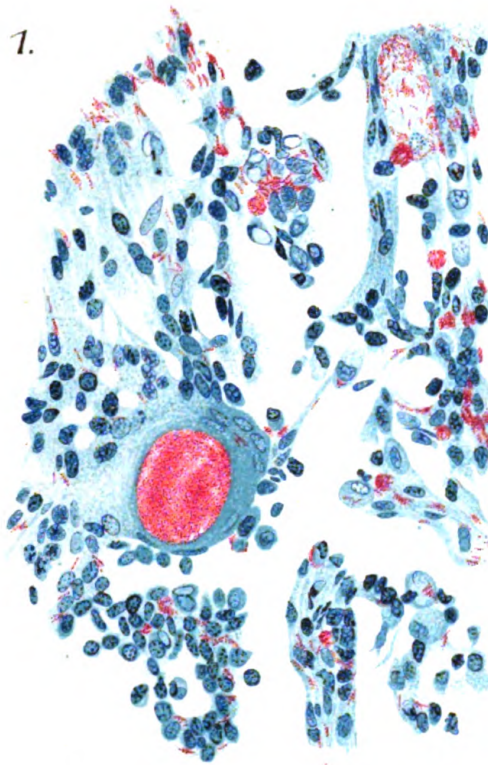


Verlag von Gustav Fischer in Jena

Lit. Anst. v. E. A. Finkbe, Leipzig







Verlag von Gustav Fischer in Jena

Lith. Anst. v. E. A. Funke, Leipzig







Verlag von Gustav Fischer in Jena

Lith. Anst. v. E. A. Junke Leipzig



## Tafel IV.

Fig. 1. Ein stark vergrößerter Teil der Tafel III. Ein kleines Gefäß, überfüllt mit deutlich gefärbten Bacillen (Ziehl-Neelsen). Zeiss, Immers. 1,5, Apert. 1,30, Kompens.-Ok. 4, verläng. Tub. 16.

Fig. 2. Kaninchen No. 5. Ein Abschnitt der in der Iris entwickelten granulomatösen Knötchen (Färbung nach Unna zur Differenzierung der lebenden von den toten Bacillen). Zeiss, Immers. 1,5, Apert. 1,30, Kompens.-Ok. 4, verläng. Tub. 16.

- a) Gruppen von blau gefärbten Bacillen,
- b) gelb gefärbte Bacillen,
- c) Pigmentkörnchen.

## Tafel V.

Kaninchen No. 5 (Zeiss, Obj. AA, Ok. 1). Die Alterationen betreffen fast ausschließlich die Regenbogenhaut und die Processus ciliares, und sind am intensivsten auf der hinteren Irisoberfläche in der Hinterkammer, wo man eine bedeutend große Masse granulomatösen Aussehens beobachtet, entstanden durch das Zusammenfließen mehrerer mehr oder minder entwickelter granulomatöser Knötchen. Diese Masse geht ohne Unterbrechung in das Irisstroma über, welches in Mitleidenschaft gezogen ist und tiefgehende Strukturveränderungen zeigt, so daß es nur noch an der Anwesenheit zerfallener Pigmenthäufchen zu erkennen ist. In dem vorderen resp. oberflächlichen Teil sieht man zahlreiche Blutgefäße und eine starke Infiltration mit Elementen des epitheloiden Typus.

- a) Hornhaut,
- b) Reste der Vorderkammer,
- c) in der Hinterkammer entwickelte granulomatöse Knötchen,
- d) Processus ciliares.
- e) Pigmenthäufchen.

*Nachdruck verboten.*

## Studies on fowl cholera.

## I. A biological study of ten strains of the fowl cholera organism.

[Contribution No. 15 from the Division of Biology of the Rhode Island Agricultural Experiment Station, Kingston, R. I., U. S. A.]

By Philip B. Hadley.

For more than a century the disease of poultry, now known as fowl cholera, has been recognized in Europe as a serious menace to the poultry raising industry. First appearing in the United States about the year 1875, it has gradually established itself, until now its presence is fairly common through the New England and Middle Western states. Every year there are reported, in increasing number, epidemics in which poultrymen lose from a few hundred to several thousand fowls. The study of the disease in the United States has therefore become a matter of considerable economic importance. The present investigation, which deals with the biological relations of several strains of the cholera organism, *Bact. bipolaris septicus*, is intended to serve as a basis for subsequent immunological studies, through which, it is hoped, a practical method for combatting the disease may eventually be discovered.

At first thought it might appear that there is slight justification for conducting a biological study upon a bacterial species which has been so long known, and so fully studied, as the bacterium of fowl cholera. One cannot, however, review a great deal of the literature dealing with this subject without observing that there is no little difference of opinion regarding what actually are the type-features of this organism. According

as one assumes them to be this or that, so he will make his diagnosis of the disease in question. The result is that we now have, both in this country and in Europe, a multitude of poultry diseases which, in clinical symptoms and pathological appearances, resemble fowl cholera, but which are usually held to be distinct from it, because of the characteristics of the organism concerned. What we need to know at present regarding this matter is to what extent can an organism depart in its characteristic features from the features of the fowl cholera bacterium, studied by Pasteur (1880) and Toussaint (1879), and still maintain its position in the cholera group. The present paper attempts to answer this question, so far as it can be answered by a study of only ten different strains of the fowl cholera organism; and to present a few other data on the resistance of these bacteria to various types of stimuli, including both chemical and physical agents.

It should be stated at the outset that the strains here described were derived, with two exceptions, from epidemics of fowl cholera occurring in the Eastern United States. The two cultures which formed the exceptions were secured from the Pasteur Institute, of Paris. In all cases the epidemics from which the cultures were obtained were characteristic of fowl cholera, both in clinical symptoms and in pathological appearances. In some cases the mortality was slight, suggesting the presence of an organism of only moderate virulence. But in other cases the mortality was extreme, in one epidemic leaving less than five hundred out of a flock of four thousand five hundred birds. All the cultures studied have been secured since August 1909, and have been subsequently maintained upon laboratory media, with occasional passages through fowls or laboratory animals.

Table I.

Showing the main cultural features of the organisms studied in the present investigations.

Culture number	Morphology				Cultural features						Biochemical features											
	Size, in micra	Motility	Spores	Gram's stain	Bouillon	Ring or pellicle	Grows in closed arm	Grows at 22° C	Grows at 37° C	Grows at 42° C	Liquefaction	Milk			Gas production			Nitrates reduced	% acid on dextrose	Indol		
					Gelatin						Casein	Coagulates	Acidifies	Reduces	Dextrose	Saccharose	Lactose			Mannite	Ehrlich method	Salkowski-Kita-sato
XVI	0.5	—	—	—	+	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	2.4	—	—
XLII	0.5	—	—	—	+	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	2.3	—	—
XLV	0.5	—	—	—	+	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	2.3	—	—
XLVI	0.5	—	—	—	+	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—	+	4.2	+	+
XLVII	0.5	—	—	—	+	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	++	1.5	—	+
XLVIII	0.4	—	—	—	+	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	++	0.5	+	++
L	0.5	—	—	—	+	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	++	1.3	—	++
LI	0.5	—	—	—	+	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	1.4	—	+
LII	0.4	—	—	—	+	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.2	+	++
LIV	0.5	—	—	—	+	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2.3	—	—

Table 2.

Showing the results of tests for indol-production by the Salkowski-Kitasato and by the Ehrlich method.

Method	Media	XVI	XLII	XLV	XLVI	XLVII	XLVIII	L	LI	LII	LIV
Salkowski-Kitasato	Dextrose-free Bouillon	—	+	+	+	+	++	+	+	+	—
Ehrlich	idem	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 perc. peptone	—	—	—	+	—	+	—	—	+	—
	5 " "	—	—	—	+	—	+	—	—	+	—

### Action of disinfectants.

In these tests one oese of a 48-hour bouillon culture was placed in a tube containing 5 c. c. of the disinfecting solution. At intervals thereafter an oese was removed and stroked on agar or inoculated into bouillon.

Table 3.

Showing the effect of carbolic acid, in various strengths, upon the fowl cholera organisms.

(+, indicates growth after exposure to the acid.)

Culture	15 min.						30 min.						1 hour						2 hours						4 hours					
	1%	0.9	0.7	0.5	0.4	0.3	1%	0.9	0.7	0.5	0.4	0.3	1%	0.9	0.7	0.5	0.4	0.3	1%	0.9	0.7	0.5	0.4	0.3	1%	0.9	0.7	0.5	0.4	0.3
XVI	—	+	+	+	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
XLII	—	+	+	+	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
XLV	—	+	+	+	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
XLVI	—	+	+	+	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
XLVII	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
XLVIII	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L	—	+	+	+	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
LI	—	+	+	+	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
LII	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
LIV	—	—	+	—	—	+	—	—	—	+	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	+

It was demonstrated early in the course of the experiments that the cholera organisms were slightly resistant to weak acids, either in solutions or in media. Believing that this circumstance might be made use of in developing therapeutic measures, the actual resistance to dilutions from normal hydrochloric acid was studied, with the following results. The technique was the same as that employed in the tests of the resistance to carbolic acid.

Table 4.

Showing the resistance of some of the cholera cultures to hydrochloric acid.

(+ indicates growth after exposure to the acid.)

Culture	15 min.						30 min.						1 hour						2 hours						4 hours					
	N/40	N/80	N/100	N/160	N/320	N/640	N/40	N/80	N/100	N/160	N/320	N/640	N/40	N/80	N/100	N/160	N/320	N/640	N/40	N/80	N/100	N/160	N/320	N/640	N/40	N/80	N/100	N/160	N/320	N/640
XVI	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
XLVII	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
XLVIII	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
LII	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

## Resistance to drying.

Experiments devised to test the resistance of the cholera organism to drying were performed as follows: A drying box 6 inches wide, by 14 inches long by 6 inches deep, with a cover, the edges of which set well down over the body of the box, was constructed. In the cover were made small round holes, fifty in number, and in one end of the box was a window 3 inches square, covered with a layer of cotton placed between two square pieces of wire netting, having a  $\frac{1}{2}$ -inch mesh. The object of the holes was to enable glass rods to be dropped into the box, but supported by their corks, the object of the window was to afford ventilation. Before using, the box sterilized by flowing steam.

For carrying the culture during the drying period, sterilized glass rods 15 cm. long and about  $\frac{1}{2}$  cm. in thickness were employed. Corks were fitted over one end of the rods, and after being sterilized under steam pressure, the rods were dipped about 4 cm. deep in a 48 hour old broth culture of the organism. After draining, they were placed through the holes in the box cover, and were left hanging, being supported by the corks, which also covered the holes. Here the rods were allowed to dry for varying periods. At the present time cultures that have dried for 3 months have proved capable of development when the rods were removed from the box and immersed for a moment in tubes of bouillon. The extreme limit of the drying that can be withstood by the organisms cannot be stated at this time.

Table 5.

Showing the resistance of the cholera cultures to drying.  
A (+) indicates that the organisms were still alive after the period mentioned.

Period	XVI	XLII	XLV	XLVI	XLVII	XLVIII	XLIX	L	LI	LII
16 hours	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 day	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2 days	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3 "	+	+	+	+	+	+				—
4 "	+	+	+	+	+	—				—
5 "	+	+	+	+	+	—				
6 "	+	+	+	+	+					
7 "	+	+	+	+	+					
1 month	+	+	+	+	+					
2 months	+	+	+	+	+					
3 "	+	+	+	+	+					

## Resistance to heat.

Experiments devised to test the resistance of the organisms to heat were performed as follows. Bouillon cultures were made and incubated for 24 hours. A water bath was heated to the desired temperature and the cultures were placed in it. After a definite period they were removed and sub-cultures were made. The technique was also modified as follows: Bouillon cultures were made, and submitted directly to the desired temperature in the water bath, after which the cultures were incubated. These two methods gave uniform results throughout and made it appear that the organisms were killed by heating at  $63^{\circ}$  C. for 15 minutes. They were not all killed by heating at  $62^{\circ}$  for the same time. It was also ascertained that the organisms grow well at  $42^{\circ}$  C., although the optimum temperature lies between  $37^{\circ}$  C. and  $40^{\circ}$  C.



Table 6.  
Showing the resistance of the cholera cultures to heat.

Grows after 15 min. ex- posure to	XVI	XLII	XLV	XLVI	XLVII	XLVIII	L	LI	LII	LIV
60° C.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
62° "	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
63° "	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

### Pathogenesis.

A very great difference in the virulence of the cholera organism for the ordinary laboratory animals and for poultry was observed. In fact, taking all the cultures together, many grades of virulence were found. Of course it cannot be assumed that the virulence manifested under laboratory conditions was always representative of the virulence obtaining in poultry epidemics under natural conditions. Some of the cultures were not obtained until the crisis of the epidemic was passed, and the organisms apparently some what attenuated. Moreover, long maintenance upon laboratory media usually tends to decrease the virulence.

Table 7.  
Showing the pathogenicity of the cholera organisms for laboratory  
animals, pigeons and fowls.

(All cultures inoculated were grown for 48 hours in bouillon at 38° C.)

Culture	Fowls				Pigeons		Guinea-pigs			Rabbits			Geese	Ducks	Turkeys	Guinea-hens	Sparrows	
	Subcutaneous	Intra-muscular	Intra-peritoneal	Feeding	Intra-muscular	Feeding	Subcutaneous	Intra-peritoneal	Intra-venous	Subcutaneous	Intra-peritoneal	Intra-venous	Intra-muscular	Feeding	Intra-muscular	Feeding	Intra-muscular	Feeding
XVI	+	+	+	+	+	+												
XLII	+	+	+	+	+	+												
XLV																		
XLVI																		
XLVII																		
XLVIII	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LI																		
LII																		
LIII																		
LIV																		

### Attempt to raise virulence of culture.

It has been commonly assumed that the rapid passage of a virus through animals of a certain species may cause an increase in virulence, while a similar passage through animals of a different species may serve to attenuate the virulence. In view of our lack of knowledge regarding the origin of most poultry epidemics of the cholera-type, and in view of the apparent sudden acquisition of virulence on the part of organisms of the para-typhoid or colon type, the question naturally arises: Is it possible that any of the wild birds or mammals which occasionally frequent the poultry yard, serve to heighten the virulence of the fowl-

cholera organism? We know that pigeons in particular are common transient visitors at many poultry plants, in both town and country districts. We know, moreover, that pigeons are readily susceptible to virulent cultures of the fowl cholera organism, and that they have, in several instances, been found to harbor, while in good health, cholera-like germs. It therefore appeared important to ascertain whether or not, under experimental conditions, pigeons, as a result of inoculations with a slightly virulent strain of the cholera organism, could, in the course of time increase the virulence of the parasite, either for themselves or for fowls. Consequently, the following tests, calculated to throw light on this point, were made.

The technique of the work was as follows: Each pigeon in the series received, by intramuscular inoculation (breast), 3 c. c. of a ninety-six-hour old bouillon culture. Upon the death of the pigeon the feathers were plucked from the breast, the muscle was seared with a hot scalpel, a slight incision was made with the point of a sterilized knife, and, by means of a platinum needle, a culture was taken, both on slant agar and in bouillon. Both were at once incubated at 38° C. If the culture on agar gave every appearance of being pure, it was assumed that the bouillon culture, which was taken at the same time, and from the same location, was also pure; and this culture was consequently inoculated into the next pigeon of the series. This procedure prevented much loss of time. The results of the nine tests are presented in the following table:

Table 8.  
Showing the result of attempts to increase the virulence of culture XVI by successive passages through pigeons.

No.	Band No.	Inoculated	Culture	Died	Period	Inoc. Rec. No.
1	635 B	Nov. 1, 1910	XVI	Nov. 7, 1910	6 d	295
2	28 H	" 11, 1910	XVI C <sub>1</sub>	" 15, 1910	4 "	299
3	556 A	" 19, 1910	XVI C <sub>2</sub>	" 24, 1910	3 "	303
4	599 A	" 28, 1910	XVI C <sub>3</sub>	Dec. 2, 1910	3½ d	305
5	489 A	Dec. 5, 1910	XVI C <sub>4</sub>	" 11, 1910	6 d	327
6	4 A	" 16, 1910	XVI C <sub>5</sub>	" 21, 1910	5 "	331
7	261 B	" 31, 1910	XVI C <sub>6</sub>	Jan. 5, 1911	5 "	335
8	455 B	Jan. 9, 1911	XVI C <sub>7</sub>	" 16, 1911	6 "	337
9	319 B	" 20, 1911	XVI C <sub>8</sub>	Alive <sup>1)</sup>	—	338

As a result of these tests it is clear that the passage of the virus through eight pigeons did not appear to heighten its virulence. The fact that the last pigeon in the series (319 B) survived, can perhaps be explained on the assumption that this bird possessed a greater resistance than the others. Such individuals are occasionally met with among pigeons, as among rabbits and guinea pigs. Obviously the method used to infect pigeons was unnatural since natural infection probably comes, in the majority of cases, by way of the mouth. It is possible that such infections would yield different results. From this experiment it appears probable, however, that avirulent organisms, existing under natural conditions, are not made more virulent as a result of accidental passages through pigeons. It may be said here that similar attempts were made

1) March 1, 1911.

to raise the virulence of some of the other attenuated organisms, by passages through pigeons, but in no case were these successful.

#### The number of individual organisms inoculated.

This point is one of some importance, in view of the fact that the number of organisms is, in the last analysis, the only accurate quantitative measurement we have of infective material. Upon the amount of infective material which a bird ingests, or which enters the blood stream through cuts or bruises in the skin, depends the chance of infection. The dilutions were, in all cases, made by the use of tubes each containing 9 c.c. of sterile bouillon. 1 c.c. of a freshly incubated (24 hours), bouillon culture was transferred, by means of a standardized 1 c.c. pipette, to the first tube containing 9 c.c. of bouillon. From this tube 1 c.c. was withdrawn and placed in the second tube; and so the series was continued. Each tube was well shaken before the 1 c.c. portions were withdrawn. The inoculations were made within a half-hour after the dilutions were completed. The following table presents the results of one count which was made of a certain number of the dilutions that were inoculated. In this instance the inoculations proved fatal through the dilution representing one part culture to ten quadrillion parts of sterile bouillon.

Table 9.

Showing the number of organisms present in high dilutions of a bouillon culture of XLVIII.

	Dilutions c. c.	Organisms	Inoculation
1	0.000 000 001	9720	Fatal
2	0.000 000 000 1	7020	"
3	0.000 000 000 01	3480	"
4	0.000 000 000 001	2220	"
5	0.000 000 000 000 1	370	"
6	0.000 000 000 000 01	51	"
7	0.000 000 000 000 001	0	"
8	0.000 000 000 000 000 1	4	"
9	0.000 000 000 000 000 01	0	Not fatal
10	0.000 000 000 000 000 001	0	" "

#### Conclusions.

As bearing upon the underlying factors which determine virulence or non-virulence, there should be mentioned briefly certain of the cultural features manifested by XLVIII as opposed to most of the other cholera cultures. The question arises: is there present any appreciable correlation between high virulence, on the one hand, and on the other, high indol production (Salkowski-Kitasato method), and low acid-production, together with lack of ability to reduce nitrates, slight growth on ordinary bouillon, slight resistance to heat, carbolic acid, etc.? These features characterize culture XLVIII as opposed to all the other cultures except LII; and culture LII proved more pathogenic than several of the others. The difference in virulence between LII and XLVIII was, however, so great that LII should be placed with the cultures of slight virulence. Thus, leaving out of consideration culture LII, it appears that the most virulent strain (XLVIII) is characterized by a high indol-production (Salkowski-Kitasato method), a low acid-production



(0.3 per cent or under), and a slight power to reduce nitrates; and that, on the other hand, the slightly virulent, or avirulent strains are characterized, as a rule, by a low indol-production, a high acid-production (even to 4.2 per cent), and a high nitrate-reducing ability. Until the cultural characteristics of LII were fully worked out, it appeared that the peculiarities of the two groups (virulent and avirulent) mentioned above, might be in some definite way connected with the physiological state which underlies the property of virulence. It was believed furthermore, that in these observations we might have a hint as to therapeutic possibilities. For instance, would conditions in the body, or in cultures, which discourage high indol-production, decrease virulence; and would conditions that favor high acid-production, or a marked reduction of nitrates, secure similar results.

Data have not yet been secured which will answer these questions; and the cultural features exhibited by LII constitute a contradiction to the general law that is otherwise apparent. Therefore, further speculation on this subject is, at the present, unprofitable.

In considering the question of indol-production by the different cultures, one other point remains to be mentioned; and this concerns the comparative value of the two methods commonly employed for testing indol-production. As has been stated, and as is shown in statistical form in table 2, two methods were used, the Salkowski-Kitasato method and the Ehrlich method which was introduced in 1906 by Böhme. The application of this test by Telle and Huber (1911) to cultures of Paratyphoid B, *B. suipestifer*, *B. enteritidis* Gärtner, and Typhus appeared to demonstrate that these cultures, which had usually been stated to produce indol, failed completely to give an indol reaction; whereas the same method, in check tests, revealed the presence of indol when present in the proportion of 1:2000000 parts of water. By the use of Crossinini's modification it is stated that indol was detected in 5000000 parts. This appears to furnish valid grounds for doubting results of many earlier tests for indol made by the Salkowski-Kitasato method and by other corresponding methods. For this reason the earlier tests of indol-production by the fowl cholera organism were also rendered doubtful, and it appeared desirable to obtain new data on this point, gained by a comparative study of the two methods. The results of these studies are presented in table 2. They demonstrate that by the earlier method all cultures of the cholera organism, except XVI, showed the presence of indol, when grown six days in dextrose-free bouillon. Ehrlich's method failed to show indol in any of these cases when the cultures were grown for the same time in the same media. When, however, the cultures were grown in peptone solution (1 per cent) for fifteen days, indol was detected only in XLVI, XLVIII and LII. Cultures in 5 per cent peptone gave corresponding results. It is thus clear that the two cultures (XLVIII, LII) which gave the strongest indol-reaction when the Salkowski-Kitasato method was employed, also gave a reaction by the Ehrlich method; but that several cultures that revealed the presence of indol by the former method (XLII, XLV, XLVII, L, LI) gave no indol-reaction by the Ehrlich method. There are, thus, apparent discrepancies arising from the use of the two methods, and which shall be taken as more reliable must be determined by further investigation.

But to return to the suggestions given by the fore-going observations to the possibilities of therapeutic action in the case of fowl cholera. It has been ascertained that alkaline or neutral solutions or media favor the development of the cholera organism, and that acid solutions oppose development. But since the fact is apparent that there is no correlation between luxuriance of growth in artificial media and virulence for fowls or for rabbits, it cannot be at once concluded that alkaline or neutral media modifies, directly at least, the degree of virulence. The writer (1910) has elsewhere demonstrated that the subcutaneous inoculation of a 5 per cent solution of carbolic acid has the power to modify, in fowls infected artificially, the course of the disease; and often to prevent an intending infection. It was then suggested that the beneficial effect of the carbolic acid might be derived in one of two ways: 1) through imparting a germicidal power to the body fluids; 2) through "neutralizing" the so-called antiphagaine bodies [see Tchistovitch (1909)] thus permitting a more energetic phagocytosis. It is now apparent that there may be added to these two, a third possibility, the production of an acid reaction in the body fluids and tissues, and a consequent retardation of the growth of the organism therein. It is conceivable that this factor may be supplementary to one or both of those mentioned above. It is therefore highly important to ascertain the manner in which carbolic acid exerts its physiological action. We are just entering into a new understanding of the rôle played by chemical substances in warding off intending infections, or in combatting those that already exist; and in this category of therapeutic activity there may yet be found a safer, surer method of treating poultry diseases than any which at present exist.

We come now to a consideration of the cause of fowl cholera as a polymorphic micro-organism. The term „polymorphism“ will here be employed in its broadest sense, to include all cultural features, as well as those relating purely to morphology. What evidence do the present researches bring either for or against this view? This question is one of considerable difficulty, but there are several points which are clear: First it is apparent that conditions of environment have a marked influence in determining the morphological characters (especially size) of the fowl cholera organism. It is also clear that conditions of environment modify, but to a smaller extent, the cultural features of the organism.

That conditions of environment modify the size of the cholera organism is shown especially by the observations made on culture XVI. When this organism was first obtained from the epidemic it appeared as a minute, polar-staining rod, some of the elements being so short as to appear like cocci. The size was about  $0.3\ \mu$  by  $0.4\ \mu$  or  $0.5\ \mu$ . Bouillon was faintly clouded. After the organism had been maintained for some weeks on agar and bouillon, a change began to occur. The organisms were now larger, and some that might be regarded as involution forms appeared. The size continued to increase, notwithstanding frequent passages through fowls, until the individuals attained the size of  $0.5\ \mu$  by  $0.8\ \mu$  or  $0.9\ \mu$ , and some were even  $1.2\ \mu$  in length. With the increase in size the polar-staining character was partly lost. Likewise the pathogenicity decreased, with the growth on agar as well as on bouillon became slightly more luxuriant. At the present time this organism, on agar maintains an average size of  $0.5\ \mu$  by  $0.9\ \mu$ .

In cultures XLII, XLV and XLI which were obtained from epidemics that were much less severe than the outbreak from which culture XVI was derived, the organisms were, at the outset, slightly larger than XVI. Culture XLVII, which possessed only slight virulence for birds or for laboratory animals, was composed likewise of rather large organisms, while XLVIII on the other hand, which proved to be the most virulent culture studied, was also the smallest. It was even smaller than XVI at the time the latter was isolated, having a breadth of  $0.2\ \mu$  —  $0.3\ \mu$  and length of  $0.35\ \mu$  —  $0.4\ \mu$ . After several transplantations on ordinary agar the size of XLVIII increased slightly.

Cultures L, LI, LII and LIV were not obtained in a highly virulent condition, and manifested the typical morphological (and, with the exception of LII, the cultural), features of the avirulent type; that is to say the individuals were larger, the variability was greater, and the bipolar staining was less pronounced.

Taking into consideration the points mentioned in the preceding paragraphs, we may tentatively conclude that, regarding the point of morphology, the organism of fowl cholera is not polymorphic in the sense that the *B. diphtheriae*, for instance, is polymorphic. It is true that in both there is a correlation between a certain form of the organism and virulence; but, while in the case of the diphtherial bacillus, there appears to be a more or less permanent adherence to type, in the case of the cholera organism the virulent type appears to change over very readily into the avirulent; and it has yet to be demonstrated that the avirulent type cannot under favorable conditions, again change to the virulent. Furthermore, if the cholera organism is not polymorphic in the sense in which this term applies to the diphtherial organism, it can probably be questioned whether the fowl cholera organism can be called polymorphic in any degree. It seems more probable that the changes in form which are manifested here, are no more important than the changes which almost any single species of microorganism may undergo when subjected to varying conditions of environment. It is true that at present we see the change occurring in only one direction, but it would be hardly safe to deny that it may also occur in the other. As previously stated, our definite knowledge in this field is as yet very slight.

But if there is no polymorphism, in the strict sense of the term, in the organism of fowl cholera, the question is still open regarding the possibility of establishing, chiefly upon the grounds of cultural characteristics, a group of pseudocholera organisms such as, for instance, the *B. pseudocholerae gallinarum* of Trincas (op. cit.). Do all the cholera-like organisms, such as those described in this paper, belong to a single group, the individual strains of which differ from one another chiefly with respect to their virulence; or do they represent two or more groups, morphologically similar, but whose chief point of differentiation lies in the pathogenicity, which remains fairly constant for each group, being high in one and low in the other? Trincas (1908) appears to base the separation of *B. pseudocholerae gallinarum* from the genuine cholera organism (*B. bipolaris septicus*) upon the three cultural features given below:

	Motility	Gram stain	Milk-coagulation
<i>B. pseudocholerae gallinarum</i> , Trincas	+	—	+
Cholera organism, <i>Bact. bipolaris septicus</i>	—	+	—



The pseudo-cholera organism of Trincas was, moreover, markedly pathogenic for fowls, guinea pigs and rabbits, whereas the genuine cholera culture studied by him was much less virulent. But it appears that variation in virulence also has a wide range, so that the minimum lethal dose for rabbits may lie at any point between 10 c. c. and 0.000 000 000 000 000 000 01 c. c. of a 48-hour bouillon culture. This point of virulence is, however, of the greatest significance, and we may not be justified in drawing final conclusions regarding the advisability of separating an avirulent group of cholera organisms until investigations have been conducted with the attempt to raise, by various means, the virulence of a previously non-virulent culture. And until the outcome of such investigations is at hand, we shall not be able to frame our attitude toward those attenuated organisms which naturally survive an epidemic. It may be thus early predicted, however, that such a separation on the grounds of virulence or non-virulence will not be possible. The grounds for this assumption lie in the observations already reported in this paper regarding the gradual loss of virulence characteristic of the organisms derived from those epidemics, whose force is spent. Until further data are at hand, it is safer to assume that, as the disease-producing power is lost, so may it be regained under certain favorable conditions of environment.

Digitized by Google

Table 10.

Showing the typical cultural differences observed in the 1) virulent, and 2) slightly virulent (or avirulent) cultures of the cholera organism.

List of Characters	Growth on ordinary agar	Growth in Bouillon	Acid-production in dextrose <sup>3)</sup>	Indol-production	Nitrate-reduction	Thermal death-point (15 minutes)	Coagulation of milk	Measurement (length)	Percent strength of Carbolic acid germicidal in 15 minutes
Slightly virulent type	M <sup>1)</sup>	M	2.18	— <sup>4)</sup>	++	63° C	+ or —	0.8 μ	1.0
Virulent type	S <sup>2)</sup>	S	0.35	+	—	62–63° C	—	0.4 „	0.4

From this data it becomes evident that there exist appreciable cultural differences between cholera organisms which are characterized by the possession of virulence, and those which are characterized by its absence. But it is also apparent that these differences are not wholly constant (at least for the avirulent group), but produce, when a considerable number of cultures is examined, a graded series in respect to the extent or degree to which these differences are manifested. There are many different degrees of indol-production, of acid-production, of nitrate-reduction and of other measurable characters; and, although it is probably not a matter of coincidence that the character of virulence, appears to be correlated in a definite manner with certain cultural features, it can scarcely be doubted that both the virulent and avirulent strains have their legitimate place in the large series of variant types; and that neither is to be set apart merely for the reason that it possesses certain characters in a greater or smaller, or in a more or less constant degree. The study of the numerical distribution of characters of a greater number of cultures than have formed the subject of this paper would doubtless furnish still better evidence for this view. Further effort will be made to secure the data.

### Summary.

This paper presents the results of a biological study of ten pathogenic micro-organisms obtained from cholera-like diseases in poultry. The results of the inquiry appear to justify the following conclusions:

1) The genuine fowl cholera (identical with that studied by Pasteur and Toussaint), is endemic in the New England States. Its prevalence is increasing.

2) All the ten strains of the fowl cholera organism studied show group-similarities, but also certain individual differences, which concern chiefly the following points: a) luxuriance of growth upon ordinary media; b) indol-production; c) nitrate-reduction; d) formation of acid on dextrose; e) resistance to heat and to carbolic acid; f) virulence.

1) Medium.

2) Sligth.

3) Average production by eight strains.

4) See data embodied in Table 2.

3) The pathogenicity of the cultures studied was characterized especially by great variation. The range of the M. L. D. of a 48-hour bouillon culture was, for fowls, from 10 c. c. to 0.000 000 000 000 001 c. c.; and for rabbits from 10 c. c. to 0.000 000 000 000 000 001 c. c.

4) Observations upon the number of organisms necessary to impart infection, as determined by counts made from the dilutions in bouillon, indicated that infection certainly resulted from the inoculation into the breast muscle of less than fifty, and probably by the inoculation of not more than four, organisms.

5) The resistance of the cultures to drying, to heat, to carbolic acid and to hydrochloric acid was tested; the results are given in Tables 3, 4, 5 and 6, respectively.

6) The cultural studies of these organisms indicate that: a) the cause of fowl cholera is not a polymorphic organism; b) there is no reason, in the case of the cultures studied, to separate a group of „pseudo-cholera“ organisms, on the basis of morphology, virulence, or of any other cultural feature. All belong in one large group, in which there is great variability with regard to these, as well as to other characteristics.

7) The slight resistance of the cholera cultures to carbolic acid, and to all acid media or solutions tried, offers a suggestion as to therapeutic possibilities. Studies involving these features are now in progress <sup>1)</sup>.

Kingston, R. I., June 1, 1911.

---

1) The writer would take this opportunity to state that he would be very glad to receive from any investigators who possess them, cultures of the fowl cholera organism. He is desirous of adding as many strains as possible to his collection.

#### Literature cited.

- Hadley, P. B., Fowl cholera and methods of combatting it. (Rhode Island Agricult. Exper. Stat. Bull. 144. 1910. p. 309—337.)  
Pasteur, Louis, De l'atténuation du virus du choléra des poules. (Compt. Rend. Acad. d. Sc. T. 91. 1880. p. 673.)  
Tchistovitch, N., Sur les antiphagines du microbe du cholera des poules. (Ann. de l'Institut. Past. T. 23. 1909. p. 834.)  
Toussaint, Rec. de méd. vétér. (Alfort). 1879. p. 946.  
Trincas, Lazzaro, Sulla batteriologia del cosiddetto colera dei polli. (Giorn. R. Soc. Ital. Ig. Vol. 30. 1908. p. 385—396.)

*Nachdruck verboten.*

## Ueber die Bildung phosphorhaltiger Gase bei Fäulnis, zugleich ein Beitrag zur Biologie des *B. putrificus* Blenstock.

[Aus dem Hygienischen Institut der k. k. Universität in Wien.]

Von Regimentsarzt Dr. W. Kulka.

Mit 2 Figuren.

Die Frage der Bildung von Phosphorwasserstoff bzw. phosphorhaltigen, flüchtigen (organischen) Verbindungen war ebenso wie deren mögliche Abspaltung unter der Einwirkung von naszierendem Wasserstoff aus faulenden Organen seit deren Anregung durch Selmi (1) kontrovers geblieben, insofern als einer Reihe von Forschern mit positiven Befunden zahlreiche andere mit negativen Ergebnissen teils bei Nachprüfung der ersteren, teils nach selbständigen Untersuchungen entgegenstanden. Um Täuschungen, die von dieser Seite drohten, auszuschließen, haben seinerzeit Ehrenfeld und Kulka (2) für den gerichtlichen Nachweis bei Phosphorvergiftungen ein geeignetes Verfahren ausgearbeitet. Damit war das Problem in seiner Bedeutung für diesen praktischen Zweck umgangen, aber keineswegs gelöst. Kruse meint zwar in seiner „Allgemeinen Mikrobiologie“ (3), daß freier Phosphorwasserstoff, der früher als Produkt der Fäulnis aufgeführt wurde, nach der jetzt herrschenden Ansicht dabei nicht gebildet wird, während Kobert in seinem bekannten Lehrbuch der Intoxikationen (4), trotzdem in seinem Laboratorium bei der Nachprüfung früherer Angaben nur negative Resultate erzielt wurden (5), die Frage keineswegs als erledigt betrachtet, ja sogar von genaueren Untersuchungen in dieser Richtung sich noch mancherlei Aufklärungen erwartet und zu derartigen Versuchen womöglich unter Benutzung von Reinkulturen anregen möchte.

In der Tat, wenn man die bisherigen diesbezüglichen Experimente einer kritischen Sichtung unterzieht, läßt sich kaum eine endgültige Entscheidung treffen.

Marpmann (6) z. B. stützte seine weitgehenden Behauptungen bezüglich der Bedeutung der  $\text{PH}_3$ -Bildung auf den angeblich knoblauchartigen Geruch und die charakteristische Verfärbung von Gold- und Silberpapier unter gleichzeitiger Kontrolle durch Bleiacetat bei faulenden Fischen, Käse u. dgl. ebenso wie beim Wachstum von Choleravibrionen! und sogar von Tuberkelbacillen auf Lecithinagar, wobei er jedoch schon auf die Bedeutung anaërober Bedingungen für diese Frage sowohl im Experiment als auch in der Natur hinwies. Daß aber knoblauchartiger Geruch und selbst die Verfärbung von Silberpapier unter Kontrolle von Bleipapier zu Täuschungen Anlaß geben kann, zeigen die schönen Untersuchungen von Abel und Buttenberg (7) über den Arsennachweis durch *Penicillium brevicaulis*. Kreps (8) fand, daß stark faulendes Gehirn zwar weder bei der bekannten Probe nach Mitscherlich, noch im Destillat Phosphorreaktion erkennen ließ, wohl aber bei Behandlung mit Zink und Schwefelsäure nach Blondlot-Dusart<sup>1)</sup> in der Silberlösung einen schwarzen Niederschlag lieferte, der wohl keine grün brennenden Gase, dagegen aber nach Oxydation deutliche Phosphor-

1) Vgl. Baumert, Lehrbuch d. gerichtl. Chemie. 2. Aufl. Bd. 1. p. 218.

säurereaktion gab. Stich (9) hingegen ließ Pepton, Kasein, Nutrose, Nuklein, Protein (Merck), Lecithin, Eidotter, Protagon und einzelne tierische Organe in Sodalösung mit 1 Proz. Traubenzuckerzusatz unter Zufügen von *B. coli* oder faulendem Pankreasgemisch bei 37° stehen. Die dabei entstehenden gasigen Produkte wurden in Bromwasser oder einer Lösung von Silbernitrat aufgefangen und im Wasserstoffstrom<sup>1)</sup> bzw. nach Oxydation mit Salpetersäure auf Phosphor untersucht. Hierbei gaben u. a. Kasein, Nuklein, Lecithin und Protagon sowie menschliches Gehirn und auch Kartoffelbrei neben primär abgespaltener Phosphorsäure im Filtrat positive Resultate. Welcher Natur die gebildeten flüchtigen Phosphorverbindungen waren, konnte bei der anscheinend geringen Menge nicht ermittelt werden. Auch Barbieri (10), der frische Gehirne unter Zusatz von Bierhefe bis zu 20 Stunden bei 45° beließ, die entweichenden Gase sammelte und hierauf die Nährlösung einer fraktionierten Destillation unterwarf, fand in den ersten Anteilen derselben auch ein knoblauchartig riechendes Gas, welches unter Verlust seines Geruches ammoniakalische Silberlösung reduzierte ebenso wie Quecksilbernitrat. Er vermutete daher eine Phosphorwasserstoffverbindung.

Diese positiven Angaben konnten aber durch eine Reihe von Nachuntersuchern nicht bestätigt werden. So ließ Hollefreund (11) bei der Nachprüfung von Selmis Resultaten Pferdehirn, Schweineleber, Pferdefleisch und ein menschliches Darmstück bis zu mehreren Wochen, Eiweiß und Eigelb (von 40 Eiern) getrennt sogar bis zu einem halben Jahr bei Zimmertemperatur an der Luft (sic!) liegen. Da er durchweg nur negative Befunde erhielt, sprach er die Vermutung aus, ob die nach der Oxydation scheinbar gefundene Phosphorsäure nicht etwa aus den Filtern stammte. Ebenso konnte Hálasz (12) aus faulendem Gehirn bei der Behandlung nach Dusart keinerlei beweisende Anhaltspunkte dafür finden. Auch A. Fischer (5), der seine Untersuchungen im Rostocker Laboratorium Koberts ausführte, gelang es, bei seinen Versuchen (Gehirn, Kartoffelbrei bei 37°, Auffangen der Fäulnisgase in Silberlösung bzw. Salpetersäure, ein Versuch mit *Penic. brevicaulis*, einer mit *B. coli*) weder nach Dusart noch durch Destillation flüchtige Phosphorverbindungen festzustellen. Allerdings hatte er zum Ueberführen der Fäulnisgase Luft zur Durchleitung verwendet. Zuletzt stellte Yokote (13) im Jahre 1904 im Würzburger Hygienischen Institut umfassende diesbezügliche Experimente an. Er überließ seine Objekte (gekochte und ungekochte Fische, Limburger Käse, Bohnen und rohes Fleisch) unter Luftzutritt bei 20°—30° der Fäulnis. In der ersten Versuchsreihe benützte er Watteverschlüsse, in der zweiten erfolgte die Ueberführung der gebildeten Gase in die Vorlage durch konstante Luftdurchleitung(!), einmal nur wurde Wasserstoff angewendet. Den Nachweis versuchte er mit Silberpapier, später aber durch Einleiten der Gase in eine Lösung von salpetersaurem Silber bzw. Bromwasser zu erbringen, jedoch ohne jeden Erfolg.

Seitdem wurden diesbezügliche Untersuchungen nicht mehr angestellt, obwohl gerade in den letzten Jahren das Problem der Fäulnis, unterstützt durch die größere Erfahrung und verbesserte Technik der Anaërobienforschung, von verschiedenen Seiten wiederholt eingehende Behandlung erfahren hat (14). Dabei kam in allen neueren Arbeiten *mutatis mutandis* wieder die von Pasteur stammende Definition der

1) Vgl. Baumert, Lehrbuch d. gerichtl. Chemie. 2. Aufl. Bd. 1. p. 218.

Fäulnis zu Ehren. So erklärt Salus (15) die natürliche, typische Fäulnis: „als die bei Luftabschluß erfolgende durch (anaërobe) Bakterien bedingte Zersetzung der Eiweißkörper und ihrer Verwandten... Sie erfolgt unter Bildung von Gasen, die zum Teil übel riechen“. Daß auch anaërobe Fäulnis bei scheinbarem Luftzutritt vor sich gehen kann (Abhaltung des Sauerstoffes durch aërobe Bakterien, Symbiose usw.) ist wohl allgemein bekannt.

Eine wesentliche Bereicherung erfuhren unsere diesbezüglichen Kenntnisse durch die Entdeckung des *Bac. putrificus*, welchen Bienstock zwar schon im Jahre 1883 zum ersten Male aufgefunden, aber erst 1899 genau beschrieben hat (16). Dessen ubiquitäres Vorkommen in der Außenwelt stellte schon sein erster Entdecker fest, während Passini (17) das regelmäßige Vorkommen dieser Keimart zumindestens im Stuhl des Erwachsenen und Rodella (18) dasselbe auch für die Mundhöhle beweisen konnten. Letzterer wies damals auf dessen wichtige Rolle bei der Pulpagangrän und der chronischen Zahncaries hin. Eine Bestätigung erfuhren diese Befunde namentlich von seiten französischer Autoren, die dieser Frage seit der Initiative Metschnikoffs seit längerer Zeit schon ein besonderes Augenmerk zugewendet hatten.

Unterwirft man nun vom Standpunkte unserer gegenwärtigen Kenntnisse aus die Arbeiten der früher angeführten Autoren bezüglich der Bildung phosphorhaltiger Reduktionsprodukte bei der Fäulnis einer näheren Kritik, so muß zugegeben werden, daß dieselben als vielfach nicht einwandfrei nach irgendeiner Richtung kaum zu verwerten sind. Sei es nun wegen der meist fehlenden oder mangelhaft durchgeführten anaëroben Bedingungen, so daß selbst tatsächlich gebildete, besonders gasförmige Reduktionsstufen durch neuerliche Oxydation sich nur allzu leicht dem Nachweis entziehen konnten, daneben da und dort auch Mängel im chemischen Nachweis; aber auch in bakteriologischer Beziehung waren es vielfach kaum näher definierte oder gar identifizierte Keimgemische, die zur Verwendung kamen. Um so weniger als ja das Ausgangsmaterial fast nie steril war. Es lag daher nahe, unter Verwertung der bisherigen Erfahrungen derartige Versuche unter besseren Bedingungen wieder aufzunehmen.

Als Fäulniserreger kamen fürs erste stets Reinkulturen des *B. putrificus* (Bienstock)<sup>1)</sup> zur Anwendung, während zunächst Rinderhirn als Nährboden herangezogen wurde. Die Bereitung desselben geschah in folgender Weise: frisches Rinderhirn wurde, von den Häuten befreit, in der Fleischmaschine fein zermahlen, ca. ein Drittel seines Volumens Leitungswasser hinzugesetzt, in große Erlenmeyer-Kolben bis zu ungefähr ein Viertel ihrer Höhe abgefüllt und dreimal in Intervallen von 18 Stunden jedesmal durch rund  $\frac{3}{4}$  Stunden im Dampftopf erhitzt. In der Zwischenzeit wurden dieselben in der Brutkammer bei 37° belassen, da Hirnnährböden auch bei Luftzutritt das Wachstum der Anaëroben ermöglichen. Zwei so sterilisierte Kontrollproben, die bei 22° verschlossen stehen blieben, erwiesen sich auch nach Wochen aërob und anaërob geprüft als steril. Im Aussehen und Geruch derselben war bis auf ein leichtes Abblassen des anfänglichen Farbtones keine Verände-

1) Zwei Stämme derselben verdanke ich der besonderen Liebenswürdigkeit des Herrn Primarius Dr. F. Passini. Dieselben wurden vor Gebrauch auf Reinheit geprüft und nach den Angaben Bienstocks und Passinis identifiziert.



zung zu konstatieren. Gehirne wurden in erster Linie wegen ihres relativen Reichtums an Phosphorverbindungen herangezogen, aber auch deshalb, weil sie zur Entwicklung der Anaërobier ein ausgezeichnetes Substrat bieten<sup>1)</sup>. Um streng anaërobe Bedingungen zu schaffen und während der ganzen Versuchsdauer zu erhalten, andererseits aber auch die Absorption der gebildeten Gase zu ermöglichen, wurde die nachstehend beschriebene Anordnung getroffen.

Ein Kippscher Apparat, der mit chemisch reinem Zink (Kahlbaum) und Schwefelsäure beschickt war, diente als Wasserstoffquelle. Zur sicheren Reinigung und Kontrolle mußte der Wasserstoff vor Eintritt in das Kulturgefäß hintereinander Waschflaschen passieren, die (a) konzentriertes Permanganat (und verdünnte Schwefelsäure), (b) alkalische Bleizuckerlösung und (c) alkalisches Pyrogallol enthielten<sup>2)</sup>. Der Erlenmeyer-Kolben (e), welcher den Nährboden enthielt, war mit einem doppelt durchbohrten Stopfen luftdicht verschlossen. Der letztere faßte

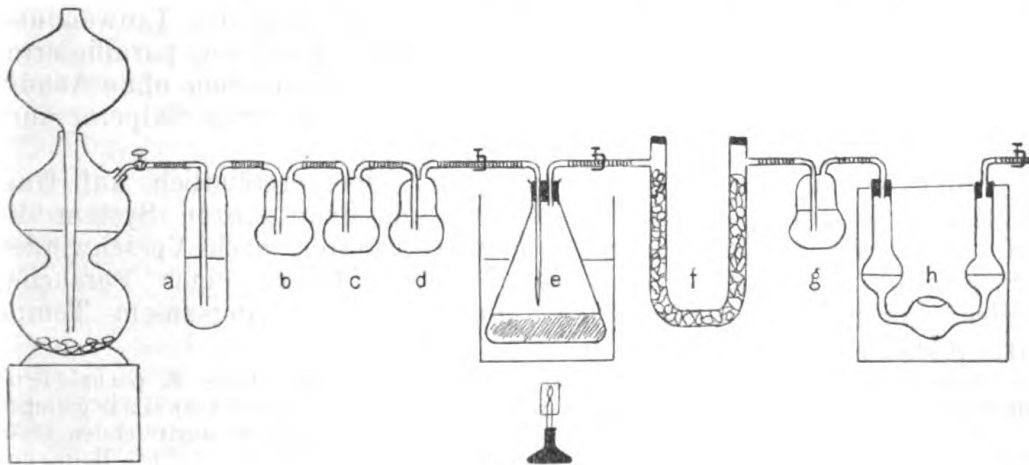


Fig. 1.

zwei rechtwinklig gebogene Glasrohre, von welchen das längere, zuführende im unteren Anteil fast kapillar ausgezogen bis nahe an die Oberfläche der Nährlösung (ohne einzutauchen!) reichte, während das andere knapp unter dem Stopfen endigte. Im ersten und zweiten Versuche wurden Korkstopfen angewendet, die mit den Glasröhren armiert separat im Trockenschrank sterilisiert wurden, und damit vor Beginn des Versuches der vorher mit Wattestopfen geschützte Kolben unter Einhaltung steriler Kautelen verschlossen und von außen gut paraffiniert. Später kamen Kautschukstopfen zur Anwendung, die mit dem Kolben noch einmal sterilisiert wurden. Die äußeren Oeffnungen der Glasröhrchen waren mit Watte geschützt. Das Kulturgefäß wurde dann in einen entsprechend weiten Blechtopf, der mit Wasser halb gefüllt war, soweit eingetaucht und mit Klemmen in dieser Lage festgehalten, daß der Wasserspiegel höher stand als das im Niveau des im Innern befindlichen Nährgemisches. Die Temperatur konnte mit Quecksilberthermoregulator und Mikrobrenner ziemlich konstant zwischen 36—38° gehalten werden.

1) Vgl. E. v. Hübner, Die pathogenen Anaëroben. Jena 1908.

2) Meist auch noch zum Ueberfluß eine Waschflasche mit Silbernitrat (d), da etwa vorhandener Phosphorwasserstoff bereits durch die saure Permanganatlösung zurückgehalten würde.

Das kürzere, zur Ableitung dienende Rohr führte zu einem mit Bimsstein und 12-proz. Kalilauge beschicktem U-Rohr (*f*), hierauf folgte wieder ein Waschgefäß mit alkalischer Bleilösung (*g*), sodann ein in lichtdichter Einhüllung gehaltenes Peligot-Rohr (*h*), in welchem sich die spezifische Absorptionsflüssigkeit (5-proz. Silbernitrat oder Kupferchlorürlösung) befand. So mußte der gereinigte Wasserstoff nach Passieren des Kulturgefäßes noch durch die Kalilauge und Bleilösung (zur Entfernung flüchtiger Fettsäuren, Kohlensäure, Kohlenwasserstoffe, Schwefelwasserstoff o. dgl.) gehen, bevor er durch die Lösung zur Absorption eventueller flüchtiger Phosphorverbindungen austreten konnte. Die Verbindungen wurden durch kurze Vakuumschläuche, womöglich Glas an Glas geschlossen, hergestellt. Nur vor dem zuführenden und nach dem abführenden Rohr des Erlenmeyer-Kolbens befand sich je ein Schraubhahn, die, wenn nicht gerade Gas durchgeleitet wurde, geschlossen waren. Ebenso auch der Quetschhahn, der das abführende Ende des Peligot-Rohres verschloß.

(In zwei Versuchen wurde mit Berücksichtigung der Einwendung Yokotes (13) an Stelle der Gummiverbindungen durchweg paraffinierter Kork mit Plastilinabdichtung verwendet, wie vorausszusehen ohne Aenderung des Ergebnisses, da weder Bromwasser noch freie Salpetersäure zur Anwendung kam.)

Vor Beginn jedes Versuches wurde selbstverständlich auf Gasdichtigkeit geprüft. Zuerst wurde dann aus dem ganzen System die Luft durch Wasserstoff verdrängt (bis 10 Minuten nach Verschwinden der Knallgasreaktion), sodann während der Dauer eines Versuches täglich zweimal durch  $\frac{1}{4}$  Stunde dieses Gas in langsamem Tempo durchgeleitet.

Versuch I. 6. Febr. Hirnnährboden mit einer großen Oese *B. putrificus* von einer Kultur auf bereits verflüssigten Eiereiweißnährboden (nach Passini) geimpft.

8. Febr. Starker Fäulnisgeruch der durch das Peligot-Rohr austretenden Gase. 10. Febr. Gelegentlich einer kurzen Abnahme des Peligot-Rohres behufs Reinigung (Ueberschlagen von Blei und Kalilauge) ist an der Oeffnung des Bimssteinrohres ein sehr deutlicher Knoblauchgeruch wahrzunehmen (auch von mehreren unbefangenen Beobachtern als solcher bezeichnet!).

14. Febr. Inhalt des Peligot-Rohres (Silberlösung und dunkler Niederschlag) filtriert, Rückstand nach Dumasart untersucht. Die vorher farblose Wasserstoffflamme zeigt nach Einbringung desselben kurze aber deutliche Grünfärbung der Flammenspitze, besonders beim Hineinhalten eines weißen (vorher ausgeglühten) Porzellandeckels. An den äußeren Teilen starke Violettfärbung durch längere Zeit.

Aussehen des Nährbodens: Zum Teil aufgelöst, schlammig, schwarzgrau verfärbt, stellenweise schwarze Streifen, penetranter Fäulnisgeruch.

Bakteriologischer Befund: Im mikroskopischen Präparat zahlreiche grampositive, gut bewegliche Stäbchen, teilweise mit endständigen mehr ovalären Sporen. Kulturell bleiben drei aerobe Agarplatten (je 1 Oese verarbeitet) durch 3 Tage beobachtet steril. Bouillon trübt sich am 2. Tage vom Boden aus, Schaumbildung Fäulnisgeruch (Buttersäure). Im Präparate dieselben Stäbchen wie oben. Davon aerobe Kontrolle auf Schrägagar, wächst anfangs als zarter Schleier vom Kondenswasser aus (mikroskopisches Aussehen unverändert), vom 3. Tag an jedoch nach fast völliger Versporung ist aerobe Züchtung nicht mehr zu erzielen. Wohl aber sofort in hoher Schicht bzw. im Buchner-Rohr. Außerdem werden je drei Oesen des Fäulnisgemisches auf drei Zuckeragarplatten ausgestrichen, die im Botkin-Apparat nach der Anordnung von Grassberger und Schattenfroh (21) gehalten werden. Am 3. Tage spärliche Kolonien aus grampositiven, beweglichen Stäbchen, davon einzelne mit endständigen Sporen. Milchkultur: am 10. Tage unter Gestank das ausgefallene Eiweiß fast ganz gelöst, so daß eine trübe Flüssigkeit resultiert.

Versuch II. (Blinder Versuch). Die Apparatur gründlich gereinigt, Waschflaschen mit frischen Lösungen gefüllt, Verbindungsschläuche durch neue ersetzt. Literkolben mit Hirnnährboden vom selben Gehirn wie bei Versuch I (dreimal sterilisiert) eingeschaltet. Versuchsanordnung sonst dieselbe. Dauer vom 23. Febr. bis



4. März. Nährboden war weder nach Farbe noch Geruch irgendwie verändert. Dusartsche Probe der Silberlösung völlig negativ.

Bakteriologische Kontrolle: Aërober Schrägagar und Bouillon sowie anaërober Traubenzucker und Gelatine im Stich bleiben steril.

Versuch III. Fortsetzung des Versuches II. Derselbe Kolben mit *B. putrificus* (von Serumkultur) geimpft. Versuchsanordnung dieselbe. 11.—20. März. Silberlösung durch Asbestfilter filtriert und nach Ludwig-Rouseff (22) im Wasserstoffstrom untersucht<sup>1)</sup>. Bei der Kontrolle brennt der Wasserstoff farblos. Sowie aber der Niederschlag auf dem Asbestfilter durch eine untergehaltene Bunsenflamme langsam bis zur Rotglut erhitzt wird, tritt, wenn auch nur kurze Zeit, eine prachtvolle tiefblauviolette Verfärbung des Flammenkegels auf, der besonders beim Hineinhalten des Porzellandeckels einen grünen Kern erkennen läßt. (Spektroskopisch aus äußeren Gründen nicht beobachtet.)

Versuch IV. Wie früher Rinderhirn, Apparatur dieselbe, nur an Stelle der letzten Silberlösung Kupferchlorür (Vgl. Baumert, Lehrbuch d. gerichtl. Chemie. p. 219) verwendet (5.—11. Mai). 11. Mai Nährboden schwarz verfärbt. Knoblauchgeruch am Kalirohr sehr deutlich, Kupferlösung grünlich. Dieselbe wird in zwei Portionen untersucht. A. Im Wasserstoffstrom nach Dusart: schwach grüner, dann blauvioletter Flammenkegel. Im Spektroskop neben der Wasserstofflinie grüne Streifen. (Baumert l. c. 212.)

B. In der zweiten Portion das Kupfer durch Schwefelwasserstoff gefällt, filtriert. Das Filtrat auf dem Wasserbad unter Salpetersäurezusatz eingedampft, in wenig destill. Wasser aufgenommen. Auf Zusatz von Ammonmolybdat schöne gelbe Färbung, am nächsten Tag ein spärlicher, deutlich kristallinischer Niederschlag (Phosphorammoniummolybdat).

12. Mai. Versuch fortgesetzt, jedoch statt Kupferchlorür wieder Silberlösung. 15. Mai. Nur sehr wenig grauer Niederschlag in derselben. Knoblauchgeruch kaum wahrzunehmen, eher Geruch nach Käse. Untersuchung auf dem Asbestfilter zeigt nur einige violette Funken, dann ist die Flamme farblos. Ebenso im Filtrat keine Phosphorsäurereaktion mehr (Silber mit Salzsäure ausgefällt, filtriert, auf dem Wasserbad unter  $\text{HNO}_3$ -Zusatz eingedampft und in wenig Wasser wieder aufgenommen).

Versuch V. Wie Versuch IV mit Kupferchlorür. (15.—20. Mai.) Deutlicher Knoblauchgeruch. Nach Dusart Wasserstofflamme schwach grün und blauviolette Färbung. In einer zweiten Portion, in welcher das Kupfer durch Kalilauge ausgefällt und filtriert wurde etc., ist im Filtrat schwache, aber deutliche Reaktion auf Phosphorsäure mit molybdänsaurem Ammon.

Ein Vorversuch mit sterilisiertem Eidotter- und Bouillonzusatz hatte dessen Zersetzung durch den *B. putrificus* unter lebhaftem auch knoblauchartigem Gestank und schwarzgrüner Verfärbung gezeigt. Es wurden daher kleinere geschlossene Gaswaschflaschen mit Eidotter so weit gefüllt, daß die inneren Einstromöffnungen des zuführenden Rohres eben noch freibleiben, sodann zweimal im Autoklaven bei drei Atmosphären durch ca. 30 Minuten behandelt. *B. putrificus* wurde in Bouillon-

1) (a) Woulffsche Flasche mit  $\text{Zu}$  und  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , daran (b) Waschflasche mit Silberlösung, Aetzkalirohre (c) und das ganz kurz gewaschene und getrocknete Asbest-

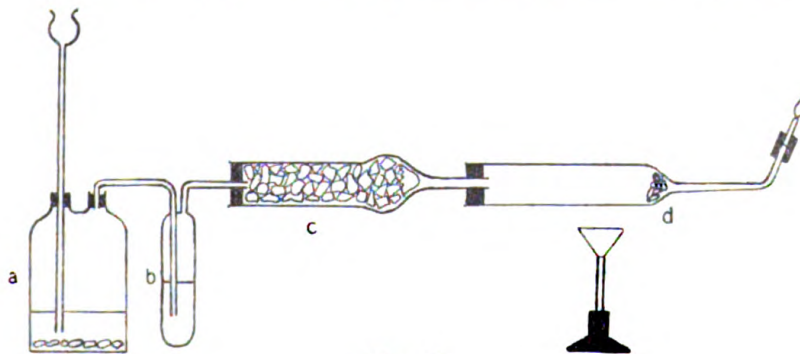


Fig. 2.

filter (d) aus hartem Glas, in welchem sich der Niederschlag befindet. Als Brenner dient ein aufgesetztes Porzellanröhrchen. (Vgl. auch Stich l. c.)

Das Asbestfilter wird natürlich vor Gebrauch gereinigt und ausgeglüht.

aufschwemmung mittels steriler Pipetten zugesetzt. Im übrigen blieb die Versuchsanordnung wie bisher.

Versuch VI. 24. März bis 4. April. Nährboden schmutzig graugrün und bräunlich verfärbt, zum Teil, besonders an den Randpartien, verflüssigt. Beim Abnehmen des Peligot-Rohres deutlicher Knoblauchgeruch. Silberniederschlag durch Asbestfilter filtriert und wie im Versuch III behandelt. Flamme im Innern und am Rande neben blavioletter Färbung deutlich grün.

Versuch VII wie oben. 4.—19. April. Nährboden wieder zum großen Teil zersetzt, Knoblauchgeruch. Silberniederschlag im Wasserstoffstrom. Flamme blaviolett und schwach grün. Spektroskopisch neben dem Wasserstoffstreifen deutlich grüne Linien.

Versuch VIII. Blinder Versuch. Versuchsanordnung wie oben ohne *B. putrificus*. Bleibt negativ.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt also, daß tatsächlich bei der Zersetzung (Fäulnis) von Gehirn bzw. Eidotter, also phosphatidreichen Organen, durch den *B. putrificus* unter anderem auch flüchtige Phosphorverbindungen entstehen können, die bei der oben geschilderten Anordnung jedesmal nachzuweisen waren. Daß es sich dabei, wenigstens zum Teil, um Phosphorwasserstoffverbindungen handelte, geht schon aus dem spektroskopischen Bilde hervor. Wahrscheinlich finden sich daneben noch andere flüchtige, organische Phosphorverbindungen, deren Natur aber wegen ihrer geringen Menge und raschen Veränderlichkeit vorläufig nicht festgestellt werden konnte. Interessant war auch, daß der spezifische Knoblauchgeruch in vielen Fällen erst nach Beseitigung der anderen Beimengungen, Fettsäuren, Schwefelwasserstoff u. a., durch die Kalilauge und Bleilösung, durch die er wohl sonst verdeckt wird, deutlicher hervortrat. Ein Umstand, der vielleicht auch dazu beitragen dürfte, die divergenten diesbezüglichen Angaben der Autoren zu erklären.

Um zu untersuchen, ob auch unter natürlichen Verhältnissen derartige Gase zu finden wären, wurde ein Versuch im Faulraum der biologischen Kläranlage der Stadt Baden bei Wien vorgenommen. Die allseits geschlossene dicke Schwimmdecke desselben wurde an einer Stelle durchstoßen und daselbst ein großer umgestürzter Glastrichter, der mit Blei beschwert wurde, so weit eingesenkt, daß seine Ränder allseits ca. 3 cm unter dem Flüssigkeitsspiegel tauchten. Hierauf wurde die Schwimmdecke wieder geschlossen. Vom Trichterrohr führte ein Schlauch zu zwei hintereinander geschalteten Waschflaschen mit alkalischer Bleilösung, an welche sich ein großes, mit Bimssteinen und konzentrierter Natronlauge beschicktes U-Rohr und an dieses ein Peligot-Rohr mit Kupferchlorür schloß. Letzteres war mit einer Mariotteschen Flasche verbunden, deren langsames Ausflußtempo von Zeit zu Zeit durch die ruckweise aufsteigenden Fäulnisgase beschleunigt wurde. In einem Zeitraum von ca. 4 Stunden traten etwa 6 l Gas durch. Dann wurde die Kupferchlorürlösung oxydiert, alkalisch gemacht und das Kupfer mit Schwefelammonium gefällt, der überschüssige Schwefel durch Salzsäurezusatz ausgeschieden und abfiltriert. Nach dem Einengen auf dem Wasserbade wurde die Salzsäure mit Ammoniak abgestumpft und unter Salpetersäurezusatz und Ammoniumlybdat erwärmt. Der schön gelbe kristallinische Niederschlag wurde am nächsten Tage gesammelt, in ammoniakalischem Wasser aufgelöst, mit Magnesiamixtur gefällt und nach 24 Stunden filtriert, gegläht und gewogen. Resultat: 2,1 mg  $Mg_2P_2O_7$ . Eine ebenso behandelte blinde Probe von Kupferchlorür blieb negativ.

Wenn nun auch die nachgewiesenen geringen Mengen gebildeter flüchtiger Phosphorverbindungen kaum Anlaß zu Irrtümern in gerichtlich-

chemischen Fällen bieten dürften, die Tatsache, daß solche überhaupt entstehen können, mag hier festgehalten werden. Es wäre jedenfalls weit verfrüht, daraus ähnliche weitgehende Schlüsse ziehen zu wollen, wie dies Marpmann (6) einfach auf Grund seiner Befunde mit Silberpapier und der Geruchsphänomene besonders für Cholera zu können glaubte. Andererseits aber muß man wohl an die von Bienstock (16) zwar in Abrede gestellten, zuletzt aber von Korentschewsky beobachteten eigentümlichen Vergiftungserscheinungen (20) denken, die beim Ueberhandnehmen von *B. putrificus* sowie bei *B. perfringens* im Darmkanal nach Fütterungsversuchen auftraten. Unwillkürlich erinnert man sich hier auch mancher anderer ihrer Aetiologie nach noch unklarer Krankheitsbilder, wie etwa der akuten gelben Leberatrophie.

In weiterer Verfolgung dieser Untersuchungen wäre vor allem noch das Verhalten isolierter phosphorhaltiger Eiweißkörper (Kaseine, Nutrose, Nukleine etc.) und Phosphatide verschiedenster Art festzustellen gewesen. Ebenso wie es nahelag, auch die Wirksamkeit anderer typischer Fäulnis-erreger, wie z. B. des *B. perfringens*, diesbezüglich zu untersuchen und noch anderes mehr. Außere Gründe<sup>1)</sup> aber, welche eine längere Unterbrechung dieser Arbeiten herbeiführten, gaben Veranlassung, die oben angeführten positiven Ergebnisse vorläufig zu veröffentlichen, um Gelegenheit zur Nachprüfung und Erweiterung derselben auch von anderer Seite zu ermöglichen. Ist ja das Problem der Reduktions-erscheinung durch Bakterien und somit auch das der Fäulnis von höchstem biologischen, aber auch pathologischen Interesse. Es sei hier z. B. nur auf die Theorien der französischen Schulen unter der Aegide Metschnikoffs (19) hingewiesen. Und in der Tat scheint sich der Kampf zwischen Zellen und Bakterien meist nicht an solchen Stellen im Körper abzuspielen, wo reichliche Mengen freien Sauerstoffs zugegen sind, sondern an Stellen des Sauerstoffmangels. Unter diesen Verhältnissen aber ist Reduktion der Ausdruck der Art und Weise, wie diese einfachen Lebewesen das komplexe molekulare Gebäude, mit dem sie in Kontakt kommen, desintegrieren<sup>2)</sup>.

#### Literatur.

- 1) Selmi, Arch. d. Pharm. Bd. 219. 1881. p. 276.
- 2) Ehrenfeld u. Kulka, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 59. 1909 u. ebenda Bd. 63. p. 315.
- 3) Kruse, W., Allgemeine Mikrobiologie. Leipzig 1910. p. 560.
- 4) Kobert, Lehrb. d. Intoxikationen. 2. Aufl. Bd. 2. 1906. p. 386.
- 5) Fischer, A., Pflügers Arch. f. Physiol. Bd. 97. p. 601.
- 6) Marpmann, A., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 22. 1897. p. 583—585 u. ebenda Abt. II. Bd. 2. 1896 u. Bd. 4. 1898.
- 7) Abel u. Buttenberg, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 32. 1899.
- 8) Kreps, zit. nach Fischer, A., Pflügers Arch. f. Physiol. Bd. 97. p. 632.
- 9) Stich, Mitt. a. d. analyt. Labor. d. Krankenhausapotheke zu Leipzig. 1898., zit. nach Chem. Centralbl. Bd. 1. 1900. p. 1137.
- 10) Barbieri, Compt. rend. de l'Acad. des sciences. T. 131. 1900. p. 347.
- 11) Hálász, Zeitschr. f. anorg. Chem. Bd. 26. p. 438.
- 12) Hollefreund, Beitrag zur Ermittlung des Phosphors bei ger. chemischen Untersuchungen. [Diss.] Erlangen 1890. Zit. nach Fischer, A., l. c.
- 13) Yokote, Arch. f. Hyg. Bd. 50. 1904. p. 118.

1) Ablauf der Kommandierungszeit zum Institut.

2) Vergl. Liborius, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 1 und v. Wichern, Arch. f. Hyg. Bd. 72. p. 1.



- 14) Liter. Uebersicht in Gerhardt, Darmfäulnis. (Ergeb. d. Physiol. Jahrg. 3. 1904.) Ellinger, Chemie der Eiweißfäulnis. (Ibid. Bd. 6. 1907. p. 1.) Kruse, W., Allgemeine Mikrobiologie. Leipzig 1910.
- 15) Salus, G., Arch. f. Hyg. Bd. 51. 1904. p. 100.
- 16) Bienstock, Arch. f. Hyg. Bd. 36 u. 39; Ann. de l'Inst. Pasteur. 1906.
- 17) Passini, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 49. 1905. p. 134.
- 18) Rodella, Arch. f. Hyg. Bd. 53 u. 59; Wien. klin. Wochenschr. 1909. No. 47.
- 19) Metschnikoff, E., Studien über die Natur des Menschen. 1904; Compt. rend. de l'Acad. des sciences. 1908.
- 20) Korentschewsky, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 59. 1911.
- 21) Liter. Grassberger u. Schattenfroh, Arch. f. Hyg. Bd. 48. 1904.
- 22) Ludwig, E. (n. Rousseff), Verhandl. d. Naturforscherversammlg. in Salzburg. 1909.

*Nachdruck verboten.*

## Charaktere der aus dem Trinkwasser einiger Schiffe isolierten Vibrionen.

[Aus dem Hygienischen Institut der Königl. Universität Palermo  
(Direktor: Prof. L. Manfredi).]

Von Dr. A. Ilvento, Dozent der Hygiene.

Die Vibrionen, deren Eigenschaften ich weiter unten besprechen werde, wurden im Laboratorium der Hafensanitätsbehörde von Palermo während des Sommers 1910 isoliert, als systematische Untersuchungen an dem Trinkwasser und dem Wasser des Sodraumes sämtlicher aus choleraverdächtigen Häfen kommenden Schiffe ausgeführt wurden. Aus dem Wasser des Sodraumes wurde nie irgendein *Vibrio* isoliert, aus dem Trinkwasser wurden 6 isoliert, welche ich zum besseren Verständnis mit einem Buchstaben des Alphabets bezeichnet aufführen werde. Aus Gründen, die ich wohl nicht näher anzugeben brauche, ist es mir nicht möglich, weiteres über Herkunft und Verladung des Wassers anzugeben, welches infiziert gefunden wurde. Die eingehende Untersuchung eines jeden *Vibrios* erfolgte in dem Hygienischen Institut der Königl. Universität Palermo, wobei ich aufs freundlichste durch die Herren Dr. Leone, Assistenten des Institutes, und Dr. Ferrara, Praktikanten, unterstützt wurde.

**Methode der Isolierung.** Es gelangte die gewöhnliche Methode der Anreicherung in 1-proz. Peptonsalzlösung bei 37° C zur Anwendung, wobei 1—3 l des zu untersuchenden Wassers benutzt wurden, die in Erlenmeyer-Kölbchen von 500—1000 ccm Inhalt verteilt waren. Die nach 10—15 Stunden des Aufenthaltes bei 37° hergestellten mikroskopischen Präparate zeigten bereits Vibrionenformen, falls solche vorhanden waren, noch bevor irgendein Schleier an der Oberfläche der Anreicherungsflüssigkeit auftrat. Zu bemerken ist, daß die in diesen ersten Präparaten beobachteten Vibrionenformen selten das charakteristische Aussehen zeigen. In der Regel handelt es sich um größere und plumpere Individuen als diejenigen, welche dann in den notwendigen Reinkulturen auftreten. Nach 15 Stunden im Durchschnitt wurde eine Ueberimpfung in Röhren mit 1-proz. Peptonsalzwater gemacht, während in der ersten Anreicherungsflüssigkeit die Nitrosoindolreaktion versucht wurde, die stets positiv ausfiel, wenn der isolierte *Vibrio* dann als Choleravibrio erkannt wurde, negativ in den anderen Fällen. In der zweiten Anreiche-



rungskultur traten die Vibrionen bereits nach 6 Stunden des Aufenthaltes bei 37° auf, häufig aber erreichten sie noch keine die anderen Keime überwiegende Entwicklung, so daß eine dritte Passage notwendig war; zweimal habe ich 5 Passagen vornehmen müssen, bevor ich eine unbedingt überwiegende Entwicklung von Vibrionen erhielt. Zu bemerken ist, daß die beiden choleraähnlichen Bacillen, auf die ich weiter unten eingehen werde, schwieriger die Oberhand in der Entwicklung auf dem Peptonwasserboden gewonnen haben.

Aus sämtlichen Anreicherungsflüssigkeiten wurden, wenn durch die mikroskopischen Präparate die Anwesenheit von Vibrionen sichergestellt wurde, Isolierungen in Gelatine, Ausstriche und auf Agarplatten, die vorher 24 Stunden bei 37° zur Verdampfung des Kondenswassers gehalten worden waren, und auf Blutagar (Dieudonné) vorgenommen. Waren Vibrionen zugegen, so zeigten die Strichkulturen auf Agarplatten die Kolonien dieser Keime nach 12–15 Stunden des Aufenthaltes bei 37° C, wenn der Ausstrich mit Material aus der ersten Anreicherungsflüssigkeit gemacht war, nach 4–6 Stunden, wenn es sich um Material zweiter Anreicherung handelte; es ist, als ob sich der Keim daran gewöhnte, einen leichten Nährboden zu finden und zu wachsen. In den Agarstrichkulturen entwickeln sich mit gleicher Schnelligkeit der Vibrionen auch die Kokken der Luft, die Protei etc.; die Vibrionenkolonien zeigen sich semitransparent, graulich, welches Aussehen übrigens den jungen Kolonien anderer Keime gemein ist. Durch wiederholte geduldige Beobachtungen ist es mir zweimal gelungen, einen Vibrio, der dann als Choleravibrio erkannt wurde, aus den mit Material der dritten Anreicherung hergestellten Agarstrichkulturen zu isolieren, ohne die Entwicklung der Kolonien in Gelatine abwarten zu müssen. Was den Dieudonné'schen Boden anbelangt, so ist an die Versuche zahlreicher Autoren zu erinnern, nach denen sich auf diesem Boden so prompt und gut wie der Choleravibrio folgende Keime entwickeln: *Proteus vulgaris* (Heim u. Glaser), *Bacterium coli commune* (Tuschinsky u. Burgers), *B. faecalis alcaligenes*, *B. fluorescens liquefaciens* und *non liquefaciens* (Glaser u. Hacla), Kokken der Luft und choleraähnliche Bacillen (Neufeld). Es ist die ganze gewöhnliche Flora der Gewässer, welche in dem Dieudonné'schen Boden ein vorzügliches Entwicklungssubstrat findet. Diese Beobachtungen aus dem Laboratorium entsprechen vollkommen dem, was ich praktisch habe erkennen können: Die Kokken- und *Proteus*-Kolonien entwickeln sich darin noch eher als der *Vibrio cholerae*; die beiden von mir isolierten choleraähnlichen Bacillen haben sich so bald und so gut darin entwickelt, wie die Choleravibrionen; schließlich haben die dann als solche der Choleravibrionen erkannten Kolonien kein spezielles makroskopisches Aussehen angenommen, welches die langwierigen Untersuchungen mit mikroskopischen Präparaten ersparen konnte. Es scheint somit, daß dieser Kulturboden keine speziellen Vorteile gegenüber den gewöhnlichen Agarstrichkulturen bietet, wenn es sich um Untersuchung des Wassers auf den Choleravibrio handelt.

Als Isolierungsboden habe ich noch den Boden von Bordet und Gengou verwendet: Mischung aus gleichen Teilen von defibriniertem Blut und Glycerinkartoffelagar, klarinettschnabelförmig erstarrt. Aber auch hier habe ich keine besonderen Vorteile gegenüber dem gewöhnlichen Agar erhalten.

Brau isolierte einen *Cholera vibrio* aus dem Trinkwasser des französischen Kreuzers D'Assas, der in der chinesischen Bai von Saigon vor Anker lag und an dessen Bord einige Cholerafälle vorgekommen waren, welche verschwanden, sobald der Gebrauch des für infiziert erkannten Wassers aufhörte. Die Anreicherungsflüssigkeit war nach der Formel Sanarellis: Pepton 1 Proz., Chlornatrium 1 Proz., Gelatine 2 Proz., Kaliumnitrat 0,10 Proz.; nach 3-stündigem Aufenthalt bei 37° C gaben die Agarstrichkulturen schöne isolierte Kolonien des *Cholera vibrios*. Ueberrascht durch den Unterschied zu dem langen Verfahren, zu dem ich zur Isolierung meiner Wasservibrionen gezwungen war, wiederholte ich den Versuch mit einem von ihnen. Eine halbe Patina einer 24-stündigen Agarkultur wurde mit 2 l gewöhnlichen vibrionenfreien, aber zahlreiche andere Keime enthaltenden Wassers gemischt; aus diesem Wasser wurden 500 ccm entnommen und in Anreicherungskultur mit Pepton und Chlornatrium 1 Proz. gebracht. Nach 2½ Stunden des Aufenthaltes bei 37° C wurden Agarstrichkulturen hergestellt und zahlreiche isolierte Vibrionenkolonien erhalten. Der Versuch wurde unter Zusatz nur 1 Oese Vibrionenagarkultur wiederholt. Die Agarstrichkulturen zeigten Vibrionenkolonien, wenn sie mit Anreicherungsmaterial von 5 Stunden 39° C vorgenommen worden waren. Schließlich wurde eine Oese Vibrionenagarkultur in 2 l Wasser gegeben, dieses 7 Tage stehen gelassen, worauf 500 ccm unter Substitution mit frischem Wasser entnommen wurden; dies wurde allwöchentlich einen Monat lang wiederholt. Die jemals entnommenen 500 ccm Wasser wurden in Anreicherungskultur mit Pepton und Chlornatrium 1 Proz. gebracht. In jedem Fall wurden keine isolierten Vibrionenkolonien mehr in den mit dem Material erster Anreicherung hergestellten Agarstrichkulturen erhalten, sondern es bildeten sich wieder vollständig die Verhältnisse aus, welche ich weiter oben bei der Isolierung der Vibrionen aus dem Wasser im natürlichen Zustand beschrieben habe.

Es ist also eine Frage des Grades und des Zeitpunktes der Verunreinigung des Wassers, in dem die Isolierung eine leichtere und raschere ist, wenn die Verunreinigung nicht so weit zurückliegt und eine starke ist. Brau ist in der Tat der Ansicht, daß das Trinkwasser des Kreuzers D'Assas, aus dem er den *Cholera vibrio* unter den oben beschriebenen Bedingungen isolierte, durch Kontakt mit einem Eingeborenen verunreinigt worden war, welcher 3 Tage vor Feststellung der ersten Fälle auf dem Schiff an Bord desselben in der Nähe der Wasserdepots gearbeitet hatte und nach Rückkehr aufs Land an Cholera erkrankte und starb.

Methoden zur Identifizierung. Außer den morphologischen und kulturellen Eigenschaften der einzelnen in Reinkultur isolierten Vibrionen wurden folgende biologische Charaktere derselben studiert:

1) Agglutination. Die große Wichtigkeit, die diesem Phänomen bei der Differentialdiagnose des *Vibrio cholerae* von den choleraähnlichen Bacillen beigemessen wird, ist bekannt. Praussnitz, Kolle und Gotschlich hatten diese Bedeutung bereits 1903 dargetan. Sämtliche Laboratorien, welche wegen der kürzlichen pandemischen Verbreitung der Cholera sich mit der Differentialdiagnose verdächtiger Vibrionen haben beschäftigen müssen, haben übereinstimmend erklärt, daß die Agglutination bei hohem Titer (1:1000) einen unbedingt entscheidenden Wert besitzt. Zwei Reihen neuerer Beobachtungen gehen etwas auseinander. Zonchello isolierte aus den Faeces Cholerakranker im Lazarett von Camaran einen *Vibrio*, welcher, obgleich er alle Eigenschaften des Cholera-

bacillus besaß, nicht durch das spezifische Serum agglutiniert wurde. Zabolotny, Jakowleff u. a. fanden im Newawasser Vibrionen, welche alle Charaktere des Kommabacillus hatten, aber sofort nach der Isolierung nicht agglutinierbar waren. Sie erwarben die Agglutinierbarkeit, wenn sie in Symbiose mit einer *Sarcina* kultiviert wurden. Ebenso isolierte Slatogoroff während der Epidemie im Jahre 1908 aus dem Wasser der Wolga 23 Rassen von Vibrionen, welche erst nach wiederholten Kulturen im Laboratorium die Agglutinierbarkeit bis zu 1:20000 erwarben. Derselbe Autor beobachtete, daß ein bei 1:10000 agglutinierbarer *Vibrio* nach einem längeren Aufenthalt im Newawasser kaum bei 1:400 agglutiniert wurde. Diese Beobachtungen sind der anderen anzureihen, daß der *Cholera*vibrio in den alten Kulturen fast vollständig die Agglutinierbarkeit verliert.

Die Probe der Agglutination ist von mir mit folgenden Details vorgenommen worden. Es wurde die Suspension einer 20-stündigen Agarkulturpatina in sterilisiertem, angesalztem Wasser 0,80 Proz. benutzt, wobei nach der Emulsionierung eine halbe Stunde stehen gelassen und mit mikroskopischen Präparaten kontrolliert wurde, ob in der Emulsion Klümpchen oder Anhäufungen vorhanden waren. Als agglutinierendes Serum wurde ein reichlich von dem Ministerium des Innern verteiltes Serum verwendet, welches den *Cholera*vibrio sicher und vollständig bei 1:5000 agglutinierte. Zur Ergänzung und Kontrolle wurde noch das im Mailänder serotherapeutischen Institut bereitete agglutinierende Serum benutzt. Die Verdünnungen des Serums wurden mit einer Pipette mit  $\frac{1}{100}$  ccm Teilung gemacht. 1 ccm der verschiedenen Verdünnungen wurde mit 1 ccm der zu untersuchenden Vibrionenemulsion in Reagensgläsern von 10 ccm mit konischem Boden gemischt und diese bei 37° C stehen gelassen. Nicht immer war die Agglutination nach 1—3-stündigem Aufenthalt bei dieser Temperatur vollständig; zuweilen war eine Verzögerung bis zu 6 Stunden zu vermerken. Die makroskopische Untersuchung wurde durch die mikroskopische Untersuchung im hängenden Tropfen eines aus der agglutinierbaren Mischung im Moment ihrer Herstellung entnommenen Tropfens Flüssigkeit und durch gefärbte Präparate, welche von Zeit zu Zeit aus den Röhren, in denen die Reaktion im Gang war, gemacht wurden, vervollständigt. Die Agglutination wurde für vollständig angesehen, wenn makroskopisch die vollständige Aufhellung der Flüssigkeit eingetreten war. Im hängenden Tropfen bekam man die vollständige Immobilisierung der Keime, welche sich sämtlich zu Haufen vereinigten. In den gefärbten Präparaten erschienen sämtliche Vibrionen ebenfalls zu starken Haufen gruppiert. Als positiv, aber unvollständig wurde sie angesehen, wenn sich zwar eine Ablagerung auf dem Boden des die Mischung enthaltenden Röhrchens bildete, die darüber stehende Flüssigkeit aber sich nicht vollkommen aufhellte; im hängenden Tropfen und in den gefärbten Präparaten erschien eine größere oder geringere Anzahl von Vibrionen isoliert.

2) Bakteriolytische Reaktion. Kolle und Gotschlich betonen den vollkommenen Parallelismus dieser Reaktion mit der der Agglutination. Die Probe wurde stets *in vitro* während meiner Untersuchungen vorgenommen. Benutzt wurde die Emulsion einer 20-stündigen Agarkultur, wie oben gesagt, das im Mailänder serotherapeutischen Institut bereitete bakteriolytische Serum, welches auf 1:300 verdünnt wurde (bei welcher Verdünnung vollständige Bakteriolyse gegen den typischen *Cholera*vibrio eintritt), und das frisch durch aseptisches Aspirieren des Blutes

aus dem Herzen eines neuen Meerschweinchens bereitete Meerschweinchenkomplement. Die die Mischung enthaltenden Röhrchen wurden mit Kontrollröhren auf 37° C gebracht. Die weitere Beobachtung geschah mit gefärbten Präparaten und auch durch Einbringen einer Oese der Mischung in eine Röhre mit geschmolzenem Agar, welcher dann klarinett-schnabelförmig erstarren gelassen und in den Brutschrank gebracht wurde. Der Ausfall wurde als positiv und vollständig betrachtet, wenn die körnige Umbildung sämtlicher Keime eintrat und die Agarkultur vollständig steril blieb oder zu weniger als 10 Kolonien von Keimen führte. Von positivem, aber unvollständigem Ausfall wurde gesprochen, wenn das Mikroskop Keime in körniger Umbildung, andere deformierte, weitere wenig oder gar nicht färbbare (Schatten) und einige gut erhaltene erkennen ließ; die Agarkulturen gaben eine ziemlich erhebliche Anzahl von Kolonien, welche jedoch zu zählen waren. Nur bei einem *Vibrio* wurde ein positives und vollständiges Resultat nach 3 Stunden 37° C erhalten, und zwar ist dies der mit A bezeichnete *Vibrio*; bei den übrigen drei war eine wechselnde Zeit bis zu einem Maximum von 22 Stunden notwendig.

3) Ablenkung des Komplementes. Die Bedeutung dieser Probe für die Differentialdiagnose des Choleravibrio ist sehr strittig und die Meinungsverschiedenheiten haben sich speziell in bezug auf die Forschungen über den *Vibrio* von El Tor gezeigt. Denn während Kraus und Ruffer diese Eigenschaft als von entscheidender Bedeutung betrachteten und dem *Vibrio* von El Tor den Charakter eines Choleravibrio infolge der fehlenden Fixierung des Komplementes absprachen, streiten Schütze, Neufeld und Handel dieser Erscheinung jegliche diagnostische Bedeutung ab. Bei den von mir isolierten Vibrionen ist die Probe mit folgenden Details angestellt worden: Da eine evidente Korrelation zwischen der Probe der Bakteriolyse und der der Ablenkung des Komplementes besteht, wurde zunächst festgestellt, bei welcher Verdünnung des spezifischen Serums und nach wie viel Stunden bei einem bestimmten *Vibrio* vollständige Bakteriolyse erhalten wurde. Darauf wurde die Probe wie für die Bakteriolyse angestellt, wobei man darauf bedacht war, kaum 2 Platinösen Komplement zuzusetzen, derart, daß in der Mischung die geringst nötige Menge des Komplementes selbst zugegen war. Nach Verlauf der nach den vorausgehenden Versuchen für die vollständige Bakteriolyse notwendigen Stundenzahl wurde mit mikroskopischen Präparaten kontrolliert, ob die Bakteriolyse wirklich vollständig war, und dann 1 ccm einer Verdünnung 1:2000 Rinderhämolysin (bereitet im Mailänder serotherapeutischen Institute) und 5 ccm einer 5-proz. Suspension roter Ochsenblutkörperchen in isotonischer Lösung zugesetzt.

Bei diesem Verfahren habe ich nie Hämolysen erhalten, während die ohne spezifisches bakteriolytisches Serum bereiteten Kontrollen Hämolysen erzeugten, sobald die Mischung auf 37° C gebracht wurde. Diese Beobachtungen werden durch folgende Erhebungen ergänzt:

a) Wenn die Probe der Fixierung des Komplementes angestellt wurde, bevor die Bakteriolyse eine vollständige war, wurde stets mehr oder weniger ausgesprochene Hämolysen erhalten.

b) Wenn die ganze Mischung für die negativ ausgefallene Probe enthaltenden Röhrchen einige Oesen frisches Komplement zugesetzt wurden, bekam man sofort einen Anfang von Hämolysen.

c) Die 4 Vibrionen sind während ihrer Konservierung im Laboratorium wiederholt der Probe der Bakteriolyse — Pfeiffersches Phänomen — unterzogen worden: Der Zeitraum, nach welchem die körnige Umbildung vollständig war, hat sich für einen und denselben *Vibrio* nicht konstant erwiesen; daraus hat sich die Notwendigkeit ergeben, jedesmal die Dauer dieses Zeitraumes festzustellen, um nicht die unter a) erklärten Verhältnisse zu bekommen.

Diese Beobachtungen rücken die Probe der Fixierung des Komplementes bei dem *Cholera*vibrio in neues Licht. Obwohl langsam und verzögert, war sie in den oben untersuchten Fällen doch stets zugegen. Ich beabsichtige die Beobachtungen an Vibrionen fäkaler Herkunft zu wiederholen.

4) Hämolyse. Die fehlende Bildung von Hämolysinen durch den *Cholera*vibrio wurde von Kraus zu einem höchst wichtigen Differentialcharakter erhoben. Seine Anschauungen wurden von Meinicke und Kolle angefochten, teilweise bestätigt durch Schuhmacher, nach welchem die roten Blutkörperchen der Taube, des Meerschweinchens, Kaninchens, Pferdes, Menschen fragil sind und unter der Einwirkung des durch den *Cholera*vibrio sezernierten proteolytischen Enzyms eine Pseudohämolyse geben können; die roten Blutkörperchen des Schweines, der Ziege, des Rindes sind resistenter und ihre Zerstörung erfolgt nur durch Einwirkung eines Hämolysins, welches von den choleraähnlichen Bacillen und nicht von der echten Cholera erzeugt wird. Auch auf dem praktischen Gebiet hat Zonchello aus den Faeces der Cholera-kranken hämolytische Vibrionen gewonnen und bei der Epidemie in Rußland im Jahre 1909 sind ebenfalls Hämolyse erzeugende Vibrionen isoliert worden. Kraus und Müller dagegen bekamen niemals Hämolyse bei den 1910 aus den Faeces Cholera-kranker zu Wien, Spandau, Preßburg, Brünn etc. isolierten Vibrionen. Mein Kollege, Herr Prof. Carapelle, machte mich auf ein Detail der Technik aufmerksam, welches leicht Irrtümer hervorrufen kann: Die Bouillon hat eine zuweilen ganz geringe, zuweilen ausgeprägtere hämolytische Wirkung. Ich hatte bereits Gelegenheit gehabt, die hämolytische Wirkung der Bouillon in vivo zu beobachten, indem ich sterile Bouillon in die Venen eines Hundes oder Kaninchens einspritzte; in der gleichen Weise können die Bouillonkulturen unabhängig von jedweden Hämolysin hämolytisch werden. Genauer ist also die Probe der Hämolyse, wenn sie mit Emulsionen von Agarkulturbelag in isotonischer Lösung und 5-proz. Suspension von ausgewaschenen roten Blutkörperchen in isotonischer Lösung angestellt wird.

5) Virulenzprobe der Vibrionen. Bekanntlich ist die Virulenzprobe mit intraperitonealen Injektionen lebender Kultur in das Meerschweinchen von 200—300 g Gewicht kein sicherer Identifizierungscharakter: Es gibt äußerst virulente Vibrionen für das Meerschweinchen, welche dagegen aus dem Wasser isoliert wurden (*Vibrio* von Ghinda), während auch neuestens der während des Sommers 1910 aus den Faeces Cholera-kranker zu Palermo isolierte *Vibrio* bei 3 ccm 24-stündiger Bouillonkultur dem Meerschweinchen keinerlei Schaden verursachte. Weiter unten werde ich die Eigentümlichkeiten der von mir studierten Vibrionen mitteilen. Den Meerschweinchen, welche die intraperitoneale Injektion der betreffenden Kulturen überlebten, wurden sukzessiv Kulturen desselben *Vibrio* in steigender Dosis injiziert, so daß eine starke Immunität erhalten wurde. Aus diesen Meerschweinchen wurde durch aseptische Aspiration aus dem Herzen, was für die Tiere keinerlei Folgen

zu haben pflegt, das Serum bereitet und dieses zur Probe der Agglutination bei hohem Titer und der Bakteriolyse gegen einen kürzlich aus einem typischen Cholerafall, der im September 1910 zu Palermo vorgekommen war, isolierten *Vibrio* verwendet.

Bei den von mir untersuchten *Vibrionen* haben wir auch ein äußerst wichtiges Datum, die Virulenz gegen den Menschen, denn das Wasser, aus dem die einzelnen *Vibrionen* isoliert wurden, war während der ganzen Ueberfahrt bis zum Hafen von Palermo zum Trinken und sonstigen Gebrauch verwendet worden.

*Vibrio* A. Isoliert aus dem Trinkwasser eines Segelschiffes, das von einem italienischen Hafen kam, wo einige Cholerafälle vorgekommen waren. Das Wasser war 6 Tage vor der Entnahme der Probe eingenommen worden und war von ganz sicherer, kontrollierter Herkunft. Es wurde aber in Fässern aufbewahrt, aus denen es je nach den Bedürfnissen mittels eines mit der Hand durchs Spundloch eingeführten Eimerchens geschöpft wurde. Die physikalische und chemische Untersuchung dieses Wassers erregte Verdacht auf Verunreinigung: Organische Stoffe = 0,0039 g O pro Liter (Methode Kubel-Tiemann), Anwesenheit von Ammoniak und Nitriten, Chloride in hoher Proportion.

Form: Dünn, kurz, krummlinig, wenige involutive Formen in den 24-stündigen Kulturen.

Beweglichkeit: Sehr groß, spiralenartig.

Geißeln (Färbung Loeffler, Ok. Leitz IV, Imm.-Obj.  $\frac{1}{12}$ , Koristka): Nur eine Geißel, zuweilen der Achsenlinie aufsitzend, zuweilen exzentrisch; ganz wenige Individuen mit zwei an einem Pol vereinigten Geißeln.

Pepton-Salzwasser 1-proz.: Entwicklung rasch (3–5 Stunden), spärliche Trübung, Häutchenbildung; Nitrosoindolreaktion positiv und stark.

Bouillon: In den ersten Kulturen geringe Trübung ohne Häutchen; nach 15 Tagen der Ueberimpfung: Starke Trübung, geringe Ablagerung am Boden, Häutchen abundant, gefältelt, fragil.

Zuckerböden (Traubenzucker, Saccharose, Invertzucker, Milchezucker 1 Proz.): Vegetiert sehr gut. Die mit Saccharose versetzten Bouillonkulturen zeigen nie Invertzucker (Fehlingsche Lösung). Die 7-tägigen, durch 1-stündiges Erhitzen auf 52° C sterilisierten und mit 2-proz. Saccharoselösungen in Kontakt gebrachten Bouillonkulturen erzeugen keine Inversion.

Säurebildung: Die vollkommen neutrale Bouillonkultur zeigt nach 24 Stunden eine saure Reaktion = 1 ccm N/10 Natriumlauge pro 10 ccm Bouillon; nach 3-tägigem Aufenthalt bei 37° C hat die Reaktion noch zugenommen und ist = 1,5 ccm N/10 Natriumlauge. Die Säurebildung ist etwas stärker in den Zuckerböden, denn in 2-proz. Milchezuckerbouillon und in sterilisierter Molke bekommt man nach 24 Stunden eine saure Reaktion = 1,3–1,8 ccm N/10 Natriumlauge pro 10 ccm Flüssigkeit und in Vollmilch nach 3 Tagen Kultur bei 37° C eine Reaktion = 6 ccm N/10 Natriumlauge. Nach 3 Monaten der Ueberimpfungen im Laboratorium verliert der Keim fast vollständig die Fähigkeit zur Säurebildung sowohl in gewöhnlichen Böden als in Zuckerböden: Nach 3-tägigem Aufenthalt bei 37° C bekommt man kaum eine geringe saure Reaktion.

Entrahnte und im strömenden Dampf sterilisierte Milch: Der Keim wuchert sehr gut und erzeugt intensive Säuerung (6 ccm N/10 Natriumlauge pro 10 ccm Flüssigkeit), infolge deren am 3. Tage der Kultur die Koagulation des Kaseins eintritt. Wenn man für die Neutralisierung der entstehenden Azidität sorgt, so erfolgt die Koagulation nicht; in gleicher Weise koagulieren die 7-tägigen, durch 1-stündiges Erhitzen auf 52° C sterilisierten Bouillonkulturen die Milch nicht: Die Bildung von Labferment ist somit ausgeschlossen. Die Gegenprobe dafür liegt darin, daß, wenn der Keim infolge der Konservierung im Laboratorium die Fähigkeit zur Säurebildung verlor, ebenfalls die Koagulation der Milch wegfiel. 15 Tage lang bei 37° C in saurem Medium sich selbst überlassen, erleidet das Gerinnsel keinerlei Veränderung. Wird die Azidität neutralisiert oder besser noch wird das Milieu alkalisch gemacht, so wird das Gerinnsel langsam disgregiert bis zur Fragmentierung desselben. Es ist also ein proteolytisches Ferment vorhanden, welches in alkalischem Milieu wirkt, so wie jene der Gruppe der Trypsine.

Gelatine in Platten: Nach 3 Tagen bei 22° C werden die charakteristischen Kolonien erhalten, deren weitere Beschreibung unnütz ist, umgeben von einem spärlichen Einschmelzungshofe.

Gelatineschich: Langsame Verflüssigung in dem initialen Teile des Stiches, welche weniger als  $\frac{1}{2}$  cm nach 5 Tagen erreicht.

Agarplatten und Agarstrichkulturen: Äußerst rasche Entwicklung, bereits nach 3 Stunden bei 37° C erkennbar. Oberflächliche, semitransparente grauliche Kolonien.



Alkalische Kartoffelscheiben bei 22° C: Nicht sehr starke Entwicklung. Bräunung der infizierten Fläche vom 2. Tage der Kultur an.

Agglutination: Vollständig bei 1:8000 nach 3 Stunden bei 37° C, unvollständig bei bedeutend höherem Titer; bei 1:100 000 bekommt man noch sehr deutliche Spuren der Erscheinung.

Bakteriolyse: Vollständig bei 1:300 nach 4 Stunden bei 37° C.

Probe der Ablenkung des Komplementes: Man läßt sich zuerst die Bakteriolyse bei 37° C auf 4 Stunden vollziehen, dann Zusatz des Hämolysins und der roten Blutkörperchen: Keine Hämolyse.

Hämolyse: Negativ für die roten Blutkörperchen des Meerschweinchens und des Ochsens.

Virulenz: 5 Personen, welche die Besatzung des Schiffes bildeten, haben das mit diesem Vibrio infizierte Wasser getrunken, ohne irgendeine Beschwerde zu bekommen bis nach 1 Monat, nachdem das Wasser mit einem anderen von sicherer Salubrität getauscht worden war. Die mit 2 ccm 24-stündiger Bouillonkultur ins Peritoneum injizierten Meerschweinchen hatten 24–48 Stunden lang Störungen von mäßiger Stärke und sehr starke Gewichtsabnahme (100 g für ein Meerschweinchen von 370 g Gewicht), welche fast 10 Tage anhielt. Ein Meerschweinchen, welches ins Peritoneum einen 24-stündigen Agarkulturbelag erhielt, verendete in 22 Stunden und zeigte bei der Sektion die Merkmale einer höchst intensiven serös-hämorrhagischen Peritonitis mit zahlreichen Vibrionen in Reinkultur in der peritonealen Flüssigkeit. Nach Immunisierung einiger Meerschweinchen wurde das entsprechende Serum bereitet und das bakteriolytische und agglutinierende Vermögen desselben gegen den erzeugenden Vibrio A, gegen die Wasservibrionen B, E und H, auf die ich etwas weiter unten eingehen werde, und gegen den kürzlich aus den Faeces eines Cholerakranken isolierten Vibrio C geprüft.

Vibrio A. Agglutination vollständig bei 1:5000, unvollständig bei 1:30 000, sehr deutliche Spuren bei 1:100 000. Bakteriolyse vollständig und intensiv bis zu 1:500, unvollständig bei 1:1000.

Vibrio B. Agglutination vollständig 1:5000, negativ 1:30 000. Bakteriolyse vollständig 1:100, unvollständig 1:300, noch vorhanden 1:1000.

Vibrio E. Agglutination nicht vorgenommen. Bakteriolyse unvollständig, aber deutlich 1:100.

Vibrio H. Agglutination vollständig 1:5000, unvollständig 1:30 000, noch merklich 1:100 000. Bakteriolyse vollständig 1:300.

Vibrio C (aus den Faeces). Agglutination vollständig 1:5000, unvollständig 1:30 000, noch merklich 1:100 000. Bakteriolyse vollständig und intensiv bis zu 1:500, unvollständig 1:1000.

Vibrio B. Isoliert aus dem Trinkwasser eines Lastdampfers, der aus einem choleraverseuchten Donauhafen kam, wo er sein Wasser eingenommen hatte. Die physikalische und chemische Untersuchung dieses Wassers hatte bereits den Verdacht auf Verunreinigung aufkommen lassen.

Form: Kurz, plump, deutlich krummlinig; nach den ersten Ueberimpfungen im Laboratorium erscheint der Keim dünner und schlank.

Beweglichkeit: Sehr groß, spiralenartig.

Geißeln: Eine polare.

Pepton-Salzwasser 1-proz.: Häutchenbildung nach 6 Stunden bei 37° C, sehr geringe Trübung; Nitrosoindolreaktion positiv, intensiv.

Bouillon: Fast absolute Flächenkultur: Fragiles, abundantes Häutchen, sehr geringe Trübung in der Tiefe.

Zuckerböden: Er wuchert sehr gut, erzeugt kein invertierendes Ferment.

Säurebildung: Keine Säurebildung weder in Bouillon noch in mit Zucker (Glykose, Laktose, Saccharose) versetzter Bouillon, noch in Molke.

Sterilisierte entrahmte Milch: Keine Säurebildung, noch Gerinnen.

Gelatine in Platten: Typische Kolonien wie der Choleravibrio, mit langsamer Verflüssigung.

Gelatinestichkulturen: Langsame kuppelförmige Verflüssigung in dem initiellen Teile des Stiches.

Agarplatten: Intensive Entwicklung, welche schon nach 3 Stunden bei 37° C angedeutet ist. Oberflächliche, semitransparente, grauliche Kolonien.

Alkalische Kartoffelscheiben bei 22° C: Spärliche und kümmerliche Entwicklung; an einigen Stellen bekommt man eine leichte Bräunung der Kulturoberfläche nach 3 Tagen; an anderen besteht eine gelbliche Färbung.

Agglutination: Vollständig bis zu 1:8000. Unvollständig, aber noch zugegen bei 1:50 000. Sie wurde nicht weiter versucht.

Bakteriolyse: Vollständig bei 1:300 nach 7 Stunden bei 37° C.

Probe der Ablenkung des Komplementes: Ausgeführt nach vollständiger Bakteriolyse. Keine hämolytische Wirkung.

Hämolyse: Negativ für die roten Blutkörperchen des Ochsens und des Meerschweinchens.

Virulenz: 19 Personen, Besatzung des Schiffes, benutzten 13 Tage lang das infizierte Wasser zu allen Gebräuchen wie zum Trinken. Es wurde nur festgestellt, daß eine dieser Personen ganz geringe Darmstörungen hatte, bevor das Schiff aus dem verseuchten Hafen auslief. Nicht aber konnte konstatiert werden, ob es sich um eine banale klinische Form oder um eine Choleraform gehandelt hatte. In letzterem Fall würde der Zweifel verbleiben, ob das Wasser das Individuum infizierte oder dieser das erstere verunreinigte. Jedenfalls blieben alle 19 Mann vollkommen gesund bis 1 Monat nach dem Wechseln des infizierten Wassers. Ein mit 3 ccm 24-stündiger Bouillonkultur ins Peritoneum injiziertes Meerschweinchen verendete in 24 Stunden und bei der Sektion wurden folgende Merkmale gefunden: Frühe Leichenstarre; Anschwellung an der Stelle der Einimpfung, serös-hämorrhagische Peritonitis, Blut viskös, pechartig. Die mikroskopische Untersuchung zeigte eine Reinkultur von Vibrionen in dem Oedem, das sich längs des Einstichkanales der Injektionsnadel gebildet hatte. In der peritonealen Flüssigkeit wurden höchst zahlreiche gut erhaltene und andere in Auflösung begriffene Vibrionen gefunden. Spärliche Vibrionen wurden auch in dem Herzblut gefunden. Aus dem subkutanen Oedem, der peritonealen Flüssigkeit, dem Herzblut wurden Verimpfungen in Bouillon gemacht und ausschließlich Reinkulturen von Vibrionen erhalten. Der Keim, der sich für das Meerschweinchen so virulent erwiesen, schwächte sich im Laboratorium äußerst rasch ab und die übrigen auch mit 5 ccm Bouillonkultur ins Peritoneum injizierten Meerschweinchen zeigten sehr ausgeprägte Störungen in den ersten 24–48 Stunden, überlebten aber. Das aus einem für diesen Keim immunsierten Meerschweinchen bereitete Serum gab folgende agglutinierende und bakteriolytische Reaktionen.

Vibrio A. Agglutination vollständig 1:1000, unvollständig 1:10 000, Spuren 1:100 000. Bakteriolyse vollständig 1:100, unvollständig 1:200.

Vibrio B (Erzeuger des Immunserums). Agglutination wie bei A. Bakteriolyse wie bei A.

Vibrio E. Agglutination: wie bei A und B. Bakteriolyse vollständig 1:200, unvollständig 1:300.

Vibrio C (aus den Faeces eines Cholerakranken). Agglutination und Bakteriolyse wie bei A und B.

Vibrio E. Isoliert aus dem Trinkwasser eines Lastdampfers, der aus demselben Donauhafen wie das vorausgehende Schiff kam. Die chemische und physikalische Untersuchung des Wassers erweckte starken Verdacht auf Verunreinigung. Organische Substanzen = 0,0012 g O pro Liter (Methode Kubel-Tiemann), Anwesenheit von Ammoniak, Nitriten, Phosphaten.

Form: Dünn, schlank, scharf krummlinig; erinnert an den Vibrio von Massaua.

Beweglichkeit: Sehr groß, spiralenartig.

Geißel: Eine, polar.

Peptonsalzwater, 1-proz.: Bildung eines dünnen Häutchens nach 6 Stunden 37° C, spärliche Trübung. Nitrosoindolreaktion positiv, intensiv.

Bouillon: Dünnes Häutchen, mäßige Trübung, Auftreten vieler Entartungsformen in den ersten 24 Stunden.

Zuckerböden: Reichliche Entwicklung; keine Bildung eines invertierenden Fermentes.

Säuren: Der Keim erzeugt keine Säuren weder in gewöhnlichen, noch in Zuckerböden, noch in Molke.

Entrahmte und sterilisierte Milch: Keine Säurebildung, noch Gerinnen.

Gelatine in Platten: Die gewöhnlichen für den Choleravibrio charakteristischen Kolonien. Neben diesen äußerst zahlreiche punktförmige, opake, gelbliche Kolonien mit scharfen Rändern, ohne irgendein besonderes Aussehen bei der mikroskopischen Untersuchung, nicht schmelzend. Aus diesen Kolonien hergestellte mikroskopische Präparate zeigen, daß sie durch Vibrionen gebildet sind. Die Kulturen in Peptonwasser, Bouillon, Zuckerböden, Agar, auf Kartoffeln, die aus diesen opaken und nicht verflüssigenden Kolonien vorgenommen werden, zeigen dieselben Charaktere, welche weiter oben beschrieben worden sind. Wird aus einer dieser durch Ueberimpfung aus einer opaken Kolonie hergestellten Kulturen eine neue Passage in Gelatineplatten gemacht, so gewahrt man, daß sich aus dem einen Stamm der opaken Kolonie auf der Gelatine wiederum viele opake und nicht verflüssigende, wenige wie gestoßenes Glas ausschende, verflüssigende Kolonien reproduzieren. Schließlich sind die mit Reinkulturen aus nicht verflüssigenden Gelatinekolonien angestellten Agglutinations- und

bakteriolytischen Proben vollkommen gleich den mit Kulturen aus verflüssigenden Kolonien vorgenommenen. Es scheint sich also nicht um zwei Vibrionenvarietäten, sondern um einen und denselben Stamm zu handeln, von dem einige Elemente jene Eigenschaften verloren haben oder im Begriffe sind zu verlieren, durch die man die charakteristische wie gestoßenes Glas ausschende Kolonie in Gelatine bekommt.

Gelatinestich: Langsame kuppelförmige Verflüssigung.

Agarplatten: Reichliche Entwicklung, welche bereits nach 5 Stunden 37° C angedeutet ist.

Kartoffelscheiben: Reichliche Entwicklung; bedeutende Bräunung der Kulturoberfläche bereits am 2. Tage; am 4. Tage charakteristische Kultur wie beim typischen *Cholera vibrio*, stärker als alle übrigen untersuchten Vibrionen.

Agglutination vollständig 1:8000. Spuren bis zu 1:100 000.

Bakteriolyse vollständig 1:300 nach 22 Stunden 37° C, unvollständig 1:500.

Ablenkung des Komplementes: Nach vollständiger Bakteriolyse, keine Spur von Hämolyse.

Hämolyse: Negativ.

Virulenz: 20 Mann von der Besatzung des Schiffes benutzten während 16 Tagen und auch länger das infizierte Wasser für alle Lebensbedürfnisse und zum Trinken. Sie hatten keinerlei Störung bis zu 30 Tagen nach dem Wechseln des Wassers gegen anderes von sicherer Herkunft. Die Meerschweinchen, mit 5 ccm 24-stündiger Bouillonkultur ins Peritoneum injiziert, zeigten nach 1–2 Tagen verschwindendes Uebelssein mit Gewichtsverlust, welcher 7–10 Tage dauerte. Das aus einem immunisierten Meerschweinchen bereitete Serum gab folgende Reaktionen:

*Vibrio A.* Agglutination vollständig 1:1000, unvollständig 1:10 000, Spuren 1:100 000. Bakteriolyse vollständig bis zu 1:1000 nur nach 24 Stunden 37° C. Nach 5 Stunden war das Phänomen kaum angedeutet an einigen Elementen, während die Mehrzahl der Keime unverändert war. Ich halte es für am Platze hinzuzusetzen, daß das Serum nach dem 6 Stunden vor der Untersuchung aus dem Herzen des Meerschweinchen extrahierten Blut bereitet und im Dunkeln aufbewahrt worden war. Es handelte sich somit um Ambozeptor und Komplement desselben Serums.

*Vibrio B.* Agglutination und Bakteriolyse wie bei A.

*Vibrio E* (Erzeuger des Immunserums). Agglutination und Bakteriolyse wie bei A und B.

*Vibrio H.* Agglutination wie bei A, B, E. Bakteriolyse unvollständig. Auch nach 24 Stunden bei der Verdünnung von 1:300, vollständig bei der Verdünnung 1:1000 (paradoxe Erscheinung).

*Vibrio C* (aus den Faeces eines Cholera-kranken). Agglutination und Bakteriolyse wie bei A, B, E.

*Vibrio H.* Isoliert aus dem Trinkwasser eines aus einem russischen Hafen des Schwarzen Meeres kommenden Schiffes. Das Wasser war im Hafen von Neapel eingenommen worden und demnach ein Wasser, das gegen jede Verunreinigung Sicherheit bot, und demnach in den Depots des während seines Aufenthaltes im russischen Hafen mit Cholera infizierten Schiffes hatte verunreinigt werden müssen. Die chemische und physikalische Untersuchung ließ keinerlei Anzeichen der Verunreinigung erkennen.

Form: Aus dem Wasser wurden zwei Vibrionentypen, beide deutlich krummlinig, isoliert; der eine dünn und gestreckt, der andere kurz und plump. In den späteren Kulturen assimilierten sich die Vibrionen vom zweiten Typus äußerst rasch denjenigen des ersten so, daß nach der 2. Passage nur noch gestreckte Vibrionen, Typus *Massaua*, vorhanden waren. Die kulturellen und biologischen Reaktionen der beiden Typen waren vollkommen identisch.

Beweglichkeit: Sehr groß, spiralartig.

Geißeln: Eine an einem Pol.

Peptonsalzwasser, 1-proz.: Trübung und Häutchenbildung. Nitrosoindolreaktion positiv.

Bouillon: Trübung und geringe Häutchenbildung. Keine degenerativen Formen in den ersten 24 Stunden.

Zucker: Säurebildung. Er entwickelt sich gut in den gezuckerten Böden, erzeugt kein invertierendes Ferment, gibt ganz leichte saure Reaktion (weniger als 0,5 ccm  $H_2SO_4$  N/10 pro 10 ccm Kultur nach 24 Stunden).

Entrahmte und sterilisierte Milch: Reichliche Entwicklung, kein Gerinnen, erzeugt ganz schwache saure Reaktion.

Gelatineplatten: Charakteristische Kolonien, langsam verflüssigend.

Gelatinestich: Langsame kuppelförmige Verflüssigung im Anfangsstück.

Agar: Sehr rasche Entwicklung; die oberflächlichen Kolonien sind ausgebreitet, graulich semitransparent.

**Alkalische Kartoffelscheiben:** Reichliche Entwicklung bei 22°; Bräunung der Oberfläche, welche am 2. Tage der Entwicklung beginnt.

**Agglutination:** Vollständig bis zu 1:8000, unvollständig bei 1:30 000, Spuren bis zu 1:100 000.

**Bakteriolyse:** Vollständig bei 1:300 nach 5 Stunden 37° C.

**Ablenkung des Komplementes:** Es wird keine Hämolyse erhalten.

**Hämolyse:** Negativ.

**Virulenz:** 21 Personen der Besatzung des Schiffes tranken während 12 Tagen das infizierte Wasser und bekamen keinerlei Beschwerden; sie blieben noch gesund bis 30 Tage nach dem Wechseln des Wassers. 5 ccm Bouillonkultur in das Peritoneum eines Meerschweinchens injiziert, erzeugten Uebelsein von 24 Stunden Dauer und Gewichtsabnahme, welche 2 Tage dauerte.

**Vibrionen L und M.** Sie wurden aus dem Wasser von aus choleraverseuchten russischen Häfen des Schwarzen Meeres kommenden Schiffen isoliert. Beide zeigten gestreckte fast geradlinige Form, ohne Beweglichkeit; keine Nitrosoindolreaktion; keine Spezifität der Kultur in den flüssigen und festen Medien; sie verflüssigten nicht die Gelatine, erzeugten keine Säuren in den gezuckerten Böden, koagulierten nicht die Milch. Auf Agarplatten und Dieudonné'schem Blutagar entwickelten sie sich so gut und so prompt wie alle anderen oben beschriebenen Vibrionen. Sie agglutinierten nicht bei 1:100, noch erfuhren sie Bakteriolyse mit den für die anderen Vibrionen benutzten spezifischen Seris; die Probe der Komplementablenkung erzeugte Hämolyse. Die Hämolyse war positiv bei Verwendung von 24-stündigen Bouillonkulturen und roten Ochsenblutkörperchen, blieb aber kaum angedeutet; negativ war sie bei Benutzung derselben roten Blutkörperchen und in isotonischer Lösung emulsionierter 24-stündiger Agarkulturbede. Die Injektion von 10 ccm Bouillonkultur von jedem der Keime in das Peritoneum von neuen Meerschweinchen rief bei dem Tiere keinerlei Störung hervor.

Ich halte es für angezeigt, die Charaktere aufzuführen, die bei einem im September 1910 aus den Faeces eines Cholerakranken isolierten Choleravibrio konstatiert wurden. In den weiter oben aufgeführten Versuchen ist derselbe als Vibrio C angegeben und diente als Vergleichsglied für die mit den Vibrionen A, B, C erzeugten Sera.

**Form:** Kurz, krummlinig; wenige Involutionsformen in den 24 Stunden alten Kulturen.

**Geißeln:** Nur eine polare.

**Peptonsalzwasser, 1-proz.:** Trübung und Häutchenbildung nach 4—7 Stunden; Nitrosoindolreaktion positiv.

**Bouillon:** Trübung und Häutchenbildung.

**Säurebildung:** Zucker. Er entwickelt sich gut in Zuckerböden, invertiert nicht Saccharose, gibt starke Mengen Säuren und behält diese seine Eigenschaft auch nach 6 Monaten der Kultur im Laboratorium.

**Entrahmte und sterilisierte Milch:** Entwicklung abundant, starke Säurebildung, durch die das Medium am 3. Tage gerinnt. Dieses Vermögen ist noch nach 6 Monaten erhalten. Es findet sich kein Labferment. Dagegen wird die Existenz eines proteolytischen Fermentes konstatiert, welches in alkalischem oder schwach saurem Medium wirkt.

**Gelatineplatten:** Charakteristische verflüssigende Kolonien.

**Gelatinestich:** Kelchartige Verflüssigung längs des Anfangsstückes.

**Agar:** Sehr rasche Entwicklung nach 3 Stunden 37° C. Oberflächliche Kolonien, graulich semitransparent.

**Alkalische Kartoffelscheiben:** Bräunung der Oberfläche am 3. Tage bei 22° C.

**Agglutination:** Vollständig 1:8000, unvollständig 1:30 000. Spuren 1:100 000.

**Bakteriolyse:** Vollständig 1:300.

**Ablenkung des Komplementes:** Es tritt keine Hämolyse ein.

**Hämolyse:** Fehlt.

**Virulenz:** Intraperitoneale Einspritzung von 2 ccm Bouillonkultur in ein Meerschweinchen von 300 g Gewicht: das Tier zeigt keinerlei Störung; nach 10 Tagen wird die Pfeiffersche Probe gemacht, indem 1 ccm Bouillonkultur in das Peritoneum dieses Meerschweinchens mit deutlich positivem Resultat injiziert wird.

Aus der Untersuchung der oben beschriebenen Charaktere ersieht man, daß der Vibrio A eine fast vollständige Identität mit dem Vibrio C menschlichen Ursprungs aufweist. Zu bemerken ist, daß der Vibrio A aus dem Wasser eines von einem choleraverseuchten italienischen Hafen

kommenden Segelschiffes isoliert wurde. Der *Vibrio C* wurde in den diarrhoischen Faeces eines cholerakranken Mädchens gefunden, dessen Vater seit 4 Tagen aus demselben Hafen, von dem das Segelschiff kam, zurückgekehrt war und gleich nach seiner Ankunft in Palermo Magen-darmstörungen hatte, welche er auf Verdauungsstörungen zurückführte und von denen er ohne jede Behandlung genas. 2 Tage nach der Heilung von seinen Beschwerden erkrankte die Tochter an einer typischen Choleraform. Auch nach der Seite der Herkunft erscheint eine nahe Verwandtschaft zwischen dem Wasservibrio A und dem menschlichen *Vibrio C*. Der *Vibrio B* unterscheidet sich etwas von den beiden vorausgehenden durch die Charaktere der Bouillonkultur (Tiefenwachstum, diffuse Trübung), durch die fehlende Säurebildung in Zuckerböden; schließlich gibt das für den *Vibrio A* bereitete Immunserum in seinen starken Verdünnungen eine weniger intensive agglutinierende und bakteriolytische Wirkung gegen den Keim B, als gegen seinen zeugenden *Vibrio*. Der *Vibrio E* zeigt folgende Differentialcharaktere: Form (Typus Massaua), fehlende Säurebildung in gezuckerten Böden, bimorphes Aussehen der Kolonien in Gelatine, Verhalten gegen das Immunserum A, Langsamkeit der Bakteriolyse mit dem Serum des Mailänder Institutes und die langsame bakteriolytische Wirkung des mit demselben *Vibrio E* erzeugten Serums. Der *Vibrio H* gleicht endlich der Form nach dem *Vibrio E*, durch die ganz geringe Säurebildung in gezuckerten Medien und in Milch dagegen den Keimen A und C. Diese Besonderheiten deuten vielleicht auf Gruppendifferenzen hin, die sich bei der biologischen Probe gegen die Tiere nicht ergeben haben. Die geringe Virulenz, die einige dieser Wasservibrionen gegen das Meerschweinchen und alle gegen den Menschen zeigten, kann hinsichtlich ihrer Identifizierung keine große Bedeutung haben. Bekannt ist z. B., daß der aus den Faeces eines Cholerakranken isolierte *Vibrio* von Courbevoie das Meerschweinchen bei 8- oder 12-stündigem Agarkulturbelag tötete und keinerlei Wirkung auf den Menschen hatte. Viele andere Vibrionen menschlicher Herkunft haben keinerlei Virulenz für das Meerschweinchen gezeigt, und dies ist auch bei den Vibrionen beobachtet worden, die bei den in Palermo im September-Oktober 1910 vorgekommenen Cholerafällen isoliert wurden. Zahlreiche Versuche haben dargetan, daß der Choleravibrio außerhalb des tierischen Organismus rasch seine Virulenz verliert, und dieser Verlust ist nach einem verschiedenen Zeitraum (3—7 Wochen) vollständig, so daß das Wasser, auch wenn es Choleravibrionen enthält, aufhört, als ein Verbreitungsmittel der Krankheit zu wirken. Dies ist vielleicht einer der Gründe, warum die Epidemien, welche ihren Ursprung im Wasser haben, plötzlich kritisch gegen die 4. Woche aufhören, wie es auch bei der kürzlichen Epidemie zu Petersburg im Jahre 1908 der Fall gewesen ist.

Es muß somit dahin geschlossen werden, daß die von mir isolierten 4 Wasservibrionen A, B, E, H Choleravibrionen sind, welche untereinander einige Gruppendifferenzen zeigen. Das bimorphe Aussehen der durch den *Vibrio E* in Gelatine erzeugten Kolonien, die spärliche Säurebildung durch den *Vibrio H*, der Verlust der Fähigkeit zur Säurebildung des *Vibrio A*, die durch alle vier für den Menschen gezeigte Virulenzlosigkeit, würden dahin schließen lassen, daß diese Keime im Wasser allmählich entarten und ihre spezifischen Eigenschaften verlieren. Nach ca. 4 Monaten jedoch der Konservierung im Laboratorium durch die gewohnten Kulturböden bewahrten die vier Vibrionen unverändert ihre Eigenschaften in bezug auf Agglutination, Bakteriolyse, Ablenkung des

Komplementes. In bezug auf den *Vibrio A* ist es leicht, den Weg anzugeben, auf dem das Wasser verunreinigt wurde: dasselbe war, wie gesagt, in einem Faß enthalten, durch dessen Spundloch es mit der Hand mittels eines Eimerchens geschöpft wurde. Angesichts des Aufenthaltes des Schiffes in einem cholerainfizierten Hafen läßt sich leicht denken, wie diese Operation den Transport von Keimen erleichtert haben kann.

Die Choleravibrionen B und E wurden in Wasser gefunden, das in eisernen Kasten enthalten war, welche keinen luftdichten Verschuß hatten. Es läßt sich nicht ausschließen, daß die Verunreinigung des Wassers während der Ueberfahrt durch eventuelle Bacillenträger unter der Besatzung erfolgt ist. Zu erinnern ist jedoch daran, daß diese Schiffe von einem Donauhafen kamen und Strössner während des Jahres 1910 aus dem Donauwasser einen durch die Agglutination als Choleravibrio erkannten *Vibrio* isolierte.

Der *Vibrio H* endlich wurde unter Bedingungen isoliert, welche ganz besondere Aufmerksamkeit erheischen. Es handelte sich um bestes Serinowasser, das einen Monat vorher in Neapel eingenommen worden war. Das Wasser war an Bord mit allen Garantien verladen und die chemische Analyse ließ keinerlei Spur von Verunreinigung erkennen. Das Schiff war einige Tage in einem choleraverseuchten russischen Hafen geblieben, doch liegen keine Anhaltspunkte für irgendeine Vermutung über den Weg der Verunreinigung vor.

Frühere Befunde von Choleravibrionen im Trinkwasser von Schiffen sind — abgesehen von denjenigen von Dunbar und Nocht in dem in den Doppelböden enthaltenen Ballastwasser — der bereits zitierte von Bran bei dem Kreuzer D'Assas, der von Zonchello im Lazarett von Camaran, in welchem Falle jedoch der Keim einige Unterschiede von dem typischen Choleravibrio zeigte, und der von Zirolia, welcher viele Berührungspunkte mit den beschriebenen Fällen hat. Letzterer *Vibrio* wurde aus dem Trinkwasser eines Dampfers isoliert, der die Reise von Kalkutta nach Glasgow gemacht und auf der Rückfahrt in Port-Said angelegt hatte, wo die Untersuchung vorgenommen wurde.

Die ätiogene Bedeutung der Wasservibrionen wurde von Metschnikoff nachgewiesen, welcher Cholerafälle beim Menschen reproduzierte, indem er Reinkulturen solcher Vibrione verschlucken ließ. Besonders bemerkenswert sind die Untersuchungen an dem *Vibrio* von Versailles. Sanarelli isolierte ihn 1893 aus dem Wasser eines Brunnens dieser Stadt, wo niemals ein Cholerafall vorgekommen war. Metschnikoff erhielt mit diesem keine Fälle experimenteller Cholera beim Menschen. Neuerdings berichtete Slatogoroff, daß eine russische Studentin eine Kultur eines aus dem Newawasser isolierten *Vibrio* verschluckte und einen Choleraanfall bekam.

An Bord eines in einem Hafen in Ladung liegenden Schiffes haben Hunderte von Personen Gelegenheit sich zu begeben, zum größten Teil aus den untersten Gesellschaftsklassen (Auslader, Bootsleute, Kohlenträger, Stauer etc.), welche die elementarsten Regeln der Reinlichkeit zu vernachlässigen pflegen. Alle diese Leute können das infizierte Schiffswasser trinken oder durch Berührung mit diesem Wasser verunreinigte Gegenstände an den Mund führen. Man bekommt so ebenso viele Bacillenträger, welche zu einem Beförderungsmittel der Ansteckung auf andere werden können oder an schweren oder leichten gastroenteritischen Formen



erkranken, welche noch nicht den typischen Verlauf haben und daher nicht in ihrer wahren Natur identifiziert werden. Ein anderer Umstand ist noch gegenwärtig zu halten: das Süßwasser an Bord endet schließlich durch die verschiedenen häuslichen Verwendungen hindurch in dem Sodraum; das Sodraumwasser wird bei der ersten Ankunft eines aus einem choleraverseuchten Hafen kommenden Schiffes in einer Sanitätsstation desinfiziert, später aber, während das Schiff vor Anker liegt, wird es in dem Maßstabe, wie es sich in dem Sodraum selbst ansammelt, ohne jegliche Desinfektion in das Hafenwasser entleert. Man kann sich leicht denken, wie auf diesem Wege die Cholerae-vibrionen des Süßwassers eines Schiffes in das Hafenwasser gelangen. Es ist bekannt, daß die Vibrionen im Meerwasser lange leben und sich darin vermehren, bekannt sind weiter die älteren Untersuchungen von Dunbar und die neueren von Deminski, aus denen sich der Befund von Vibrionen in dem Bodenschlamm zweier großer Ströme — Elbe und Wolga — viele Monate nach Erlöschen jeder Choleraepidemie in den Orten an diesen Strömen ergab. Kristian brachte die Choleraepidemie, die während des Jahres 1905 in Preußen und Polen auftrat, in Zusammenhang mit der Infektion des Flußwassers, beruhend auf dem Aufrühren des Bodenschlammes beim Fischen, Verankern etc. Taranoukhim stellte dieselbe Vermutung bei der Choleraepidemie von Samarka im Jahre 1907 auf: die Keime wären 2 Jahre lang in dem Bodenschlamm des Flusses Samarka, an dem die Stadt liegt, am Leben geblieben.

Man sieht somit, welches äußerst wichtige Zentrum der Dissemination ein Schiff darstellen kann, dessen Süßwasser durch Cholera infiziert ist. So kommt es, daß man bei den Choleraepidemien in Seehäfen häufig bis auf ein, aus einem verseuchten Hafen angelangtes Schiff zurückgehen kann; es erklärt sich aber nicht, wie die Infektion eingedrungen ist, weil an Bord dieses Schiffes alle gesund waren und blieben. So kommt es weiter, daß sämtliche Maßregeln, die zur Lokalisierung und Bewältigung der Infektion bei den ersten Fällen unternommen werden, den Zweck verfehlen, da die ersten Fälle nicht das *primum movens* der Epidemie sind, sondern der Exponent eines bereits in weitem Maßstabe erfolgten Kontagiums, das als Ausgangspunkt das infizierte Schiff hat und sich schleichend, ohne bemerkbar zu werden, abgespielt hat.

Zum Schlusse erfülle ich die angenehme Pflicht, Herrn Prof. Manfredi, der mir erlaubte, diese Untersuchungen in dem von ihm geleiteten Institut auszuführen, und der mir mit seinem Rat bei den Zweifeln, die mir im Laufe der Untersuchung auftauchten, bereitwilligst zur Seite stand, meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

#### Literaturverzeichnis.

- Berestneff, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 41. 1908. p. 80.  
 Besche u. Kohn, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 62. 1909. Heft 2.  
 Brau, Ann. de l'Inst. Pasteur. 1905. p. 812; Bull. de l'office internat. d'hyg. publ. T. 1. 1909. p. 276 et T. 3. 1911. No. 4.  
 Bürgers, Hyg. Rundschau. 1910. p. 169.  
 Dieudonné, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 50. 1909.  
 Dunbar, Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 9. 1894. p. 379.  
 Gaffky, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 40. p. 406.  
 Glaser u. Hacla, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 57. p. 376.  
 Heim, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 53. p. 557.  
 Kolle u. Gotschlich, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 44. 1903. Heft 1.  
 Kraus, Wiener klin. Wochenschr. 1903. No. 50. p. 1382.

- Kraus, Wiener klin. Wochenschr. 1906. 15. März. p. 229.  
 Kraus u. Fukuhara, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. Orig. Bd. 3. 1909.  
 Kraus u. Müller, Wiener klin. Wochenschr. 1910. No. 44. p. 1552.  
 Meinicke, Dtsche. med. Wochenschr. 1904. No. 23.  
 Meinicke, Jaffé u. Flemming, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 52. 1906. H. 3.  
 Metschnikoff, Ann. Inst. Pasteur. 1893 u. 1894.  
 Neufeld. Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 33. 1910. p. 608.  
 Neufeld u. Händel, ebenda. Bd. 26. 1907. H. 3.  
 Pergola, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 54. p. 94.  
 Praussnitz, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 18. p. 239.  
 Sanarelli, Ann. Inst. Pasteur. 1893. p. 693.  
 Schumacher, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 54. 1906. p. 65.  
 Schütze, Berlin. klin. Wochenschr. 1907. p. 800.  
 Sineff u. Drosdowitsch, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 52. 1909.  
 Slatogoroff, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 41. 1908.  
 Derselbe, ebenda, Bd. 48. 1909.  
 Strössner, Dtsche. med. Wochenschr. 1911. 2. Febr.  
 Tuschinsky, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 54. p. 91.  
 Zabolotny-Jakowleft u. a., Charkower med. Journ. Vol. 10. 1910. p. 65.  
 Zonchello, Annali d'Ig. sperim. Vol. 19. 1909. Fasc. 1.

*Nachdruck verboten.*

## On the cultivation of black variety of *Mycetoma*.

By **G. C. Chatterjee**, Ass. Prof. of Pathology, Med. Coll., Calcutta, India.

With 2 plates.

The importance of cultivation of the black variety of *Mycetoma* in pure state lies in the following facts.

1) The peculiar cultural characters which differentiate the fungus from the white variety sets at rest the controversy whether this fungus is a stage of the yellow variety or is altogether a different fungus.

2) This also settles the discussion regarding the position of the fungus in the system, whether it is a *Mycetoma Actinomyces* or a *Hypomycetes*, and lastly: —

3) It is, I believe, the first time with possibly a single exception<sup>1)</sup> that black *Mycetoma* has been cultivated in pure state and the aetiological relation of the fungus to the disease demonstrated.

The material used for cultivation of my fungus which I believe it to be the fungus of the black *Mycetoma* was obtained from a case of *Mycetoma* admitted in the Medical College Hospital. A piece of tissue was removed from a globular swelling of about the size of an orange situated in the plantar surface of the leg (Plate 4).

On making a section through the piece, numerous small black grains of about the size of a pin's head were found situated in small cavities inside the tissue. These grains were found very loosely attached and could be easily removed. Those situated on the surface at the end of the small sinuses, of which there are many, were found surrounded by a layer of pus. Those which are embedded deep inside the tissue did not show any pus formation. A large number of these granules were removed under sterile precautions and were placed in various culture

1) Wright is the only observer who can by claim to have cultivated a fungus from a case of *Mycetoma* of the melanoid variety in America. This will be referred to later on.

media. Some were kept for examination under microscope. The portion of the tissue in which the granules were not disturbed was kept for section by paraffin method.

Examination of the grains without cultivation: One of the grains was placed on a slide with a drop of water. It was then crushed by pressing a coverglass on it and examined under  $\frac{1}{6}$ th lens and then  $\frac{1}{12}$ th oil immersion. Distinct branching mycelium could be seen surrounded and intermixed with granulation cells. The threads of mycelium are flat and show a distinct uniformly dark hue, no accumulation of pigment particles in the interior of filaments could be seen. No black stained material was found situated between the filaments. Except these branching mycelial threads and a few granulation cells no other structure like crystals etc. could be found. No black matrix was found.

Section of the tissue, with the black granules situated inside showed structure of granulation tissue. In the midst of a collection of granulation cells, the black fungus can be seen (Plate 1). On account of the shrinking of the tissue, the fungus is seen separated from the tissue cells by a space. Under  $\frac{1}{12}$ th oil immersion lens, the structure of the fungus is very clearly seen. The central portion of the fungus is seen occupied by mycelial filaments which are very coarse; the individual fibers are seen forming a loose tangle in the central portion. In the peripheral zone, they are densely packed together, so that the individual fibers can be made out with difficulty. In this dense peripheral zone, the fibers are arranged radially. No structures like clubs of actinomyces are seen. As all the mycelial threads are uniformly blackish in tint, the peripheral zone assumes a markedly black colour owing to the overlapping and coming together of these threads. No deposition of pigment outside the mycelial threads are seen. Surrounding the peripheral zone of black dense mycelium are seen the granulation cells. No giant cells are seen any where. Besides these well marked fungus bodies, which can be seen by the naked eye, there are found interposed between tissue elements, small collection of black stained threads which are only distinguishable by  $\frac{1}{12}$ th lens. They lie in the subcutaneous tissue immediately beneath the epithelial layer. They are arranged longitudinally along the layer of cells. The small arterioles show distinct sign of endoarteritis; in some the lumen of the arterioles are completely obliterated.

Cultural characters: The granules which were removed from the tissue under strict precautions and placed in culture media, were found to have visibly increased in the case of those which were placed in ordinary agar tubes, and markedly so in those which were placed in glucose-agar tubes. As none of the growths were contaminated by a single contaminating organism, no difficulty was experienced in following up the cultural characters of the fungus from the original granule of the diseased tissue to fully developed growth from day to day. On the fourth day the granules was found in agar to have become 4 to 6 times its former size. It remained rounded in shape (Plate 2); no mycelial threads were found spreading from the growth to the surface of the agar. But the surface of the growth is founded covered with a fine hairy structure. The medium around the growth takes up a slightly blackish hue. Smear preparation from these showed the blackish flat branching threads showing no internal structure (*Sclerotium*) from which are seen branching out threads which are very delicate and which

took aniline stains and showed chromatic dots in thionine blue stain. No spore like structures were found. By the end of a week the growth is found to be about the size of a pea, there was still no tendency to spread. Portion removed from the growth and placed in another agar tube showed sign of growth—simple smearing with a platinum wire on the growth and then smearing on another agar tube showed no signs of growth, the growth on agar is uniformly dark in color, no pale or dark area can be differentiated. The growth is always dry.

**Bouillon:** Bits of growth in agar were removed and placed in several ordinary nutrient broth tubes (beef peptone). After 48 hours, the fragments were seen surrounded by fine radiating rays — the growth remaining firmly adherent to the wall of the tubes. Besides these, are found attached to the wall of the tube numerous minute colonies hardly visible to the naked eye—with a central nucleus surrounded by fine radiating rays. These minute colonies show no coloration. If one of these colonies be detached from the glass wall of the test tube and examined under microscope, they are found to be composed of a tangled mass of fine branching mycelium radiating from a central nucleus (Plate 3, fig. 1). The nucleus is composed of denser net work than the periphery. If one of these colonies be detached by a platinum wire and placed on an agar surface, they will grow out into a solid growth of blackish hue like the one developed from the original granule. In a broth tube in the wall of which have grown several colonies like the above be left undisturbed for some days, the colonies will be found increased in size. No diffuse growth takes place in the broth, the broth remaining clear. There is no tendency for the fungus to grow on the surface. The colonies which are situated immediately below the surface of the fluid, become blackish in color, as they get exposed to air, by the fluid getting dried up. After a time they become jet black when they are completely exposed to air. If the broth be not allowed to get dried, the colonies increase in size till they assume the size of a marble. They remain all along colorless, so long they are not exposed to air. A beautiful appearance is seen when a fragment of an old culture is placed inside a flask containing broth and then after thoroughly shaking the fluid, the flask is left undisturbed in the incubator. After a week the whole of the bottom and sides of the flask are seen studded with numerous separate colonies, each of which is surrounded by radiating rays. If however a colony which has increased to the size of a marble as a result of several weeks' growth in broth and which has not assumed dark color as the result of exposure to air, be removed from the tube in which it has grown and placed inside a flask of broth and the flask be thoroughly shaken and the flask be placed in an incubator, no separate colonies are produced. But if the colonies growing in broth which have become blackish in hue as the result of exposure to air be similarly treated as the growth from agar tube, numerous separate colonies will grow. This proves in black coloured cultures whether growing in agar or in broth spore formation occur, though they can not be demonstrated readily in smears preparation of the cultures. A section of old agar culture showed however very minute spherical jet black bodies interposed between the flat mycelial threads. These are evidently spores. The broth in which the fungus grows remains transparent—no change of colour takes place, so long the colonies

are not exposed to air. If they are exposed, then the broth assumes reddish brown colour.

**Growth in potato:** When a fragment of a growth from an agar is placed on potato, a dry black growth takes place. There is no tendency to spread—no accumulation of fluid is seen, the potato is not coloured.

**Sabouraud's Medium:** The growth is very luxuriant—the growth projects out of the surface of the medium very markedly; but there is no tendency to spread over the surface of the agar—the growth retaining its spherical appearance.

**Gelatine:** If a piece of an agar culture be removed and placed on the surface of gelatine, the growth takes the appearance of the agar culture. There is no liquefaction of gelatine; the colony is rounded in shape. Its upper surface (exposed to air) is black in colour and is covered over with fine hair. Its lower parts (inside gelatine) is reddish brown in colour and is similarly covered with fine radiating hairs. There is no tendency to spread nor any mycelial threads are formed inside the substance of the gelatine.

#### Experiments on animals.

Several guinea-pig, rabbits, rats, and a monkey were inoculated with pieces of the growth. No definite results were obtained. But as the inoculations were made with growths which were subcultured several times, before the experiment was made, it is not fair to conclude that it is no pathogenic to lower animals; as the fungus had lost its virulency by subculturing.

**Literature:** The disease has been noticed from ancient time, long before the bacteriological era, on account of presence of the peculiar black granules of macroscopic size associated with the disease. Garrison Surgeon Godfrey was the first to notice the disease. He described in *Lancet* 1846, four cases of peculiar disease in the leg, in two of which he found black particles. He described it as a disease hitherto unknown and gave the name "*Morbus tuberculosis pedis*" to the disease. He thought that the black material as an impurity or due to deposition of melanin. He did not suspect fungoid nature of the material. In October 1859 Vandyke Carter in examining an amputated leg of this nature found evidence of true fungus structure in the sinuses of the amputated leg. A month later, he found in another amputated leg of the same nature, as the above, granules which were of yellow colour, fungoid structure of which was not so evident; he still could make out a fungus in the yellow nodules. These cases he described in a paper in the *Lancet* 1874 where he put in a strong plea for considering the fungus as the cause of the disease. He was the first to apply the term *Mycetoma* to both varieties of the disease. In a monograph published in 1874, he described in more detail both varieties of the disease and repeated his arguments for considering the fungi as the cause of the disease; besides he put forward the suggestion that the black variety of the fungus is a stage of the yellow variety. In the *Indian Medical Gazette* of 1875, in a review of Carter's monogram, the editor called in question the method followed by Carter for cultivation of the fungi (cultivation of the fungus from spirit preserved specimens in non sterile rice paste). The reviewer put forward his own view which was more or less prevalent at the time that the fungi are merely accidental conta-

mination and quoted the opinion of Gilbert in support of his assertion. He was so much sure of his position that he stated later on. "We only regret that he (Vandyke Carter) has attached a causative significance to the mycelial threads in the dark particles found in some cases of Madura foot and thereby set the profession, as we believe, on a wrong track." Cunningham and Lewis who had the unique opportunity of having specimen of this disease (both yellow and black variety) sent from several distant places and also had at these disposal all the specimens of the disease in the Calcutta Medical College Pathological Museum, worked on the same line as Rev. Barkely who tried to cultivate the specimens preserved in spirit. Not only did they believe that spirit had not killed the fungi, but they believed that "the number of them present in the specimen increased whilst it remained in our hands". Conclusions which they came to, was that these fungal elements in the black granules were accidental contamination that there was no fungus in yellow variety and that both the diseases were not caused by any fungus.

A. A. Kanthack on the other hand showed conclusively that the yellow granules have got the structures like that of true *Actinomyces* and was of opinion that the black Mycetoma was also a variety of *Actinomyces*.

D. D. Cunningham in a more recent paper discussed the etiology of black Mycetoma, and described the fungoid element found in black Mycetoma as a hyphomyetes, but he stuck to his old view that both the black and the yellow varieties are not caused by any fungus at all, but are caused by endoarteritis of the small arterioles.

Boyce and Surveyor examined tissues from six cases of black Mycetoma and fifteen cases of yellow variety. They believed that the yellow variety is a delicate and lowly organised fungus presenting many of the characters of *Actinomyces*, where as the black variety is a different fungus of very highly organised species.

J. H. Wright is the only investigator who can lay claim to have successfully cultivated a fungus out of the granules in the black Mycetoma. The patient from whom the specimen was taken was an Italian woman under the care of Dr. Beach in the Massachusetts General Hospital. In describing the black granules, he states that when the granules are bleached by sodium hypochlorite, he found them to "consist of a mass of fungus structure, together with more or less brown pigmented imbedding or investing material as described by Boyce and Surveyor". He found no spores. He cultivated a hyphomycetes from the granules; most of his cultures were however contaminated with *Staphylococci*. The cultural characters of the fungus cultivated by him are the following.

**Patato:** A dense, widely spreading, adherent layer, velvety surface, pale brown in the central position, and white at the edges. Small droplets of dark coffee colored fluid develop on the surface of the culture; the medium becomes dark and brown, and very moist.

**Bouillon:** Growth proceeds from the inoculated material in fine, radiating filaments and produces puff ball like appearance and eventually the whole fluid is filled up with radiating mycelium, the fluid becomes a deep coffee brown colour and a mycelium develops on the surface. Agar (ordinary and glucose). Growth appears as a smesh work of widely spreading filaments of greyish color, on the surface of the medium.



Morphologically the hyphomycetes consists of branching hyphae from 3 to 8  $\mu$  in diameter; young forms show delicate transverse septa and older ones swelling at the points of branching, and the hyphae may appear as a string of oval ended plump segments. The filaments have a definite wall and branching occurs by lateral budding. No spore bearing organs are observed. Animal inoculation negative.

Structure of the tissue affected with the disease shows nodule very closely resembling a tubercle, surrounded by large giant cells. These are prominent elements in the lesion.

Brumpt reports a case of black Mycetoma from Suakun; culture gave negative results.

Brumpt in a paper on Mycetoma gives detailed description of the fungus observed by him in several cases of Mycetoma occurring in Africa, with several illustrative plates. He also gave lengthy quotations from other writers who worked on the subject describing the characters of the disease, materials from many of which he himself examined, so that he was in a position to have a comparative knowledge on the subject. From these he comes to these conclusion that there are eight varieties of Mycetoma caused by eight different organisms of which six are of white variety and two are of black variety. Of the two black varieties one is the classical black Mycetoma caused by „*Madurella Mycetoma*“ (Laveran) and the other is a special black variety observed by Bouffard which is produced by a fungus named by him *Aspergillus Bouffardi*. This 2nd variety was observed by Bouffard occurring in a patient admitted in Dankali (Africa) in the leg. The peculiarities noticed by him was that there was no suppuration around the black granules. Besides, these granules are big in size and are situated inside follicles. The study of the grains showed filaments of mycelium are of irregular size. They also showed numerous chlamydospores and conidia bearing conidiospores. The parasite has not been cultivated. The other variety described by Brumpt as the classical black Mycetoma, is according to the writer the same as observed in Indiaby Carter, Cunningham, Lewis and Kanthack. He also remarks that to the same variety belongs also the case described by Bassioni in Italy and Wright in the United States in an Italian woman. Brumpt described three of his own cases with illustrative plates. He found numerous chlamydospores in the granules. As regards cultivation experiments he remarks: —

„Culture. Aucun auteur ancien ou récent, n'est parvenu à cultiver le mycétome noir typique, tel que je l'ai décrit. Wright dans le cas un peu atypique qu'il aobservé, est parvenu à cultiver un champignon cloisonné, blanc, produisant des sclérotés noirs en culture étouffée ou vieille. Il ne donne aucun détail botanique; peut-être a-t-il eu affaire à des moisissures banales, comme les autres auteurs qui ont essayé de la cultiver. Des études ultérieures nous renseigneront à cet égard. Peut-être que le sclérotés du *Madurella mycetomi* ont besoin de rester plusieurs mois à l'état de vie latente pour pouvoir être cultivés. Les inoculations de grains aux animaux out toujours été négatives (Brumpt, Bouffard).“ Bouffard nor' Brumpt succeeded in cultivating it, from this it is evident that Wright's fungus was cultivated from a disease which differs from the Indian variety. Besides, thereis good ground for believing that there was a contamination, as will appear from quotation from Brumpt given above.

Babes describes black variety of *Mycetoma* and devotes a page to it in the *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen*, but no cultural characters are given. The writer remarks that biology of black *Mycetoma* still remain to be worked out. Though he must consider it now as a distinct variety and not as a phase of the yellow variety and says in this connection: „Denn es ist kein Fall bekannt, in welchem die gelbe Varietät in die schwarze übergegangen wäre, und es sind auch keine Fälle von Mischinfektion mittels des gelben und des schwarzen Pilzes bekannt. Jedenfalls wird es nötig sein, Material aus verschiedenen Gegenden vergleichend zu untersuchen, um festzustellen, ob nicht mehrere Varietäten des Pilzes die Krankheit veranlassen können.“

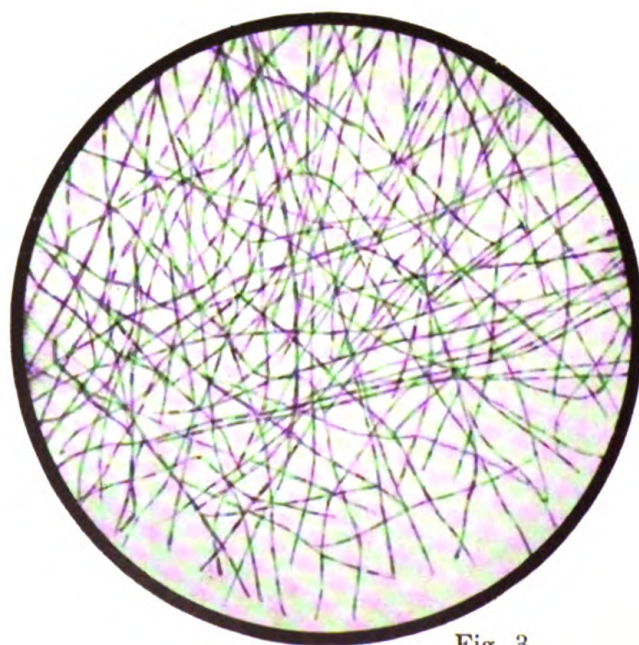
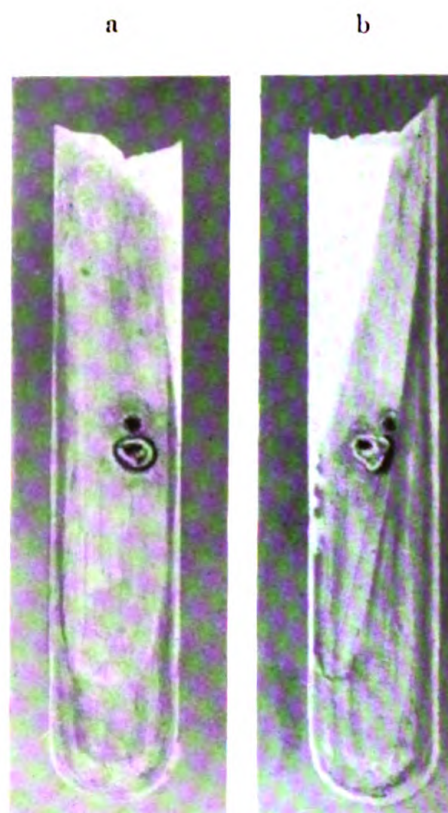
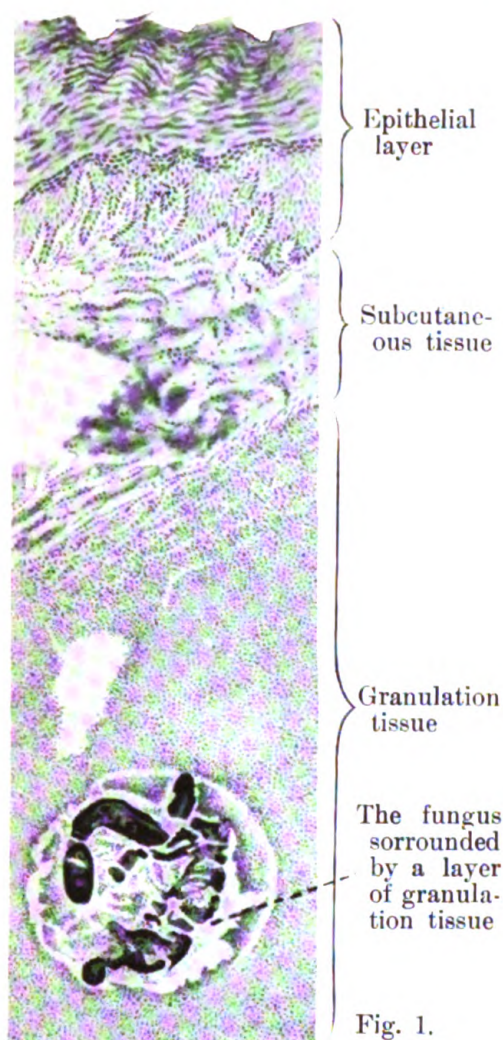
The paper of Musgrave and Clegg needs be mentioned in this connection though they did not work with black *Mycetoma*, as it contains the most exhaustive bibliography on *Mycetoma* (both yellow, black and pink variety) that has appeared within recent times.

As most of the papers referred to in this paper are not available here, I have been obliged to depend for my informations about the literature on the subject on the notes by these writers, in addition to those, I could collect together from the papers available to me.

It is evident therefore that the black variety of *Mycetoma* though known from ancient times, the determination of its nature and its aetiological significance to the disease was not properly worked out on account of the failure of the workers to grow the fungus in pure state. The views of the early workers like Gilbert, Vandyke Carter, Cunningham Lewis and Kanthack need not be taken into account in this connection, as owing to defective procedure prevalent at the time, the conclusions which they arrived at are of not much value at all. In recent times, the only worker who has worked thoroughly on the subject is Wright who is the first to cultivate a fungus from a case of melanoid variety in America, and it is the only instance known to me that it has been done so. From the description given of Wright's specimen, it will be seen that the fungus cultivated by Wright differs markedly from the one cultivated by me. The growth in potato in particular is different. In Wright's specimen it grew luxuriantly in widely meshed mycelium on the surface of potato and in this was found a collection of droplets of brownish fluid. In my case, the growth is strictly confined to the part inoculated and forms a dense solid growth which is perfectly dry. In bouillon, the fungus cultivated by me does not grow at all on the surface. The fluid is not changed in colour. Besides it shows the peculiar property of growing in separate colonies attached to the wall of the flask. In Wright's specimen no spores are found, whereas in mine spores have been found though sparingly. From all these it is evident that the fungus cultivated by me is a fungus differing from Wright's.

As in all my cultures, colonies were seen to grow out from the original granules, in pure condition, there being present no contamination, I was able to follow the development of the growth from day to day and in all the specimens the same appearances were seen. The flat black threads found in the section of the tissue and also in smear preparation of the crushed granules from the tissue do not differ in any way from those found in the old black cultures in agar. There cannot be any doubt that the fungus growing in the artificial cultures is the same as the one found in the tissue. The peculiar cultural characters









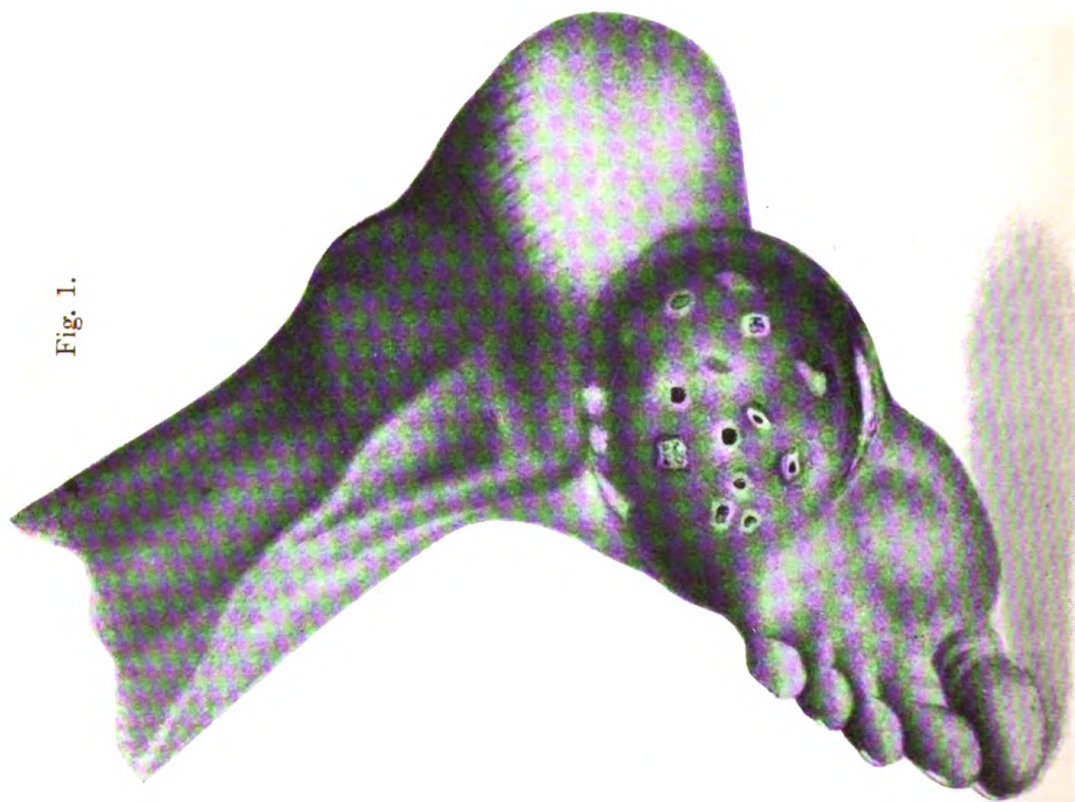


Fig. 1.

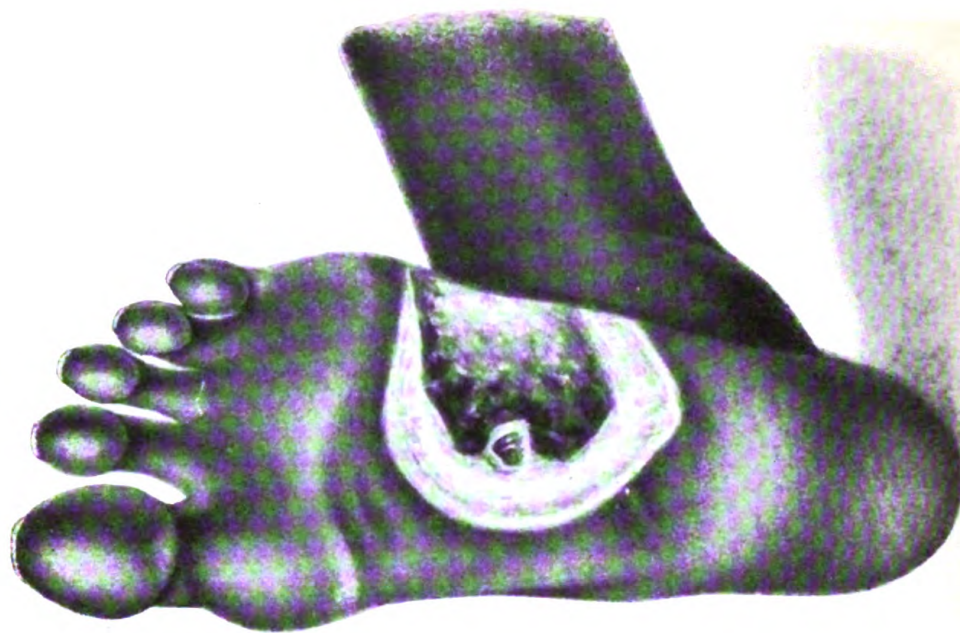


Fig. 2.

Verlag von **Gustav Fischer** in Jena.



of the fungus (sticking to the wall of flask and assuming jet black hue on getting exposed to air) also differentiates the fungus from any saprophytic fungi which are ordinarily present in air. The position of the fungus in the class Hyphomycetes is evident from the characters described above, and is therefore a distinct fungus from the fungus of the white Mycetoma. It is to be determined by future experiments whether in all cases of Madura foot of melanotic variety, the same fungus is found.

### References.

(For an exhaustive bibliography on Mycetoma in general completed up to the year 1907, see Musgrave and Clegg's paper on „the etiology of Mycetoma.“ The Philippine Journal of Science. Vol. 11. No. 6. p. 477.)

- 1) Bassini, E., Un caso di Mycetoma al piede di Madura. (Archiv. per le scienze med. Vol. 12. p. 1888. (Referred in the Kolle and Wassermann's Handbuch d. pathogen. Mikroorgan.)
- 2) Berkley, M. J., On the so called fungus foot diseases of India. (Med. Press and Circular. 1876. p. 465.)
- 3) Babes, Der Madurafuß. (Handb. d. pathogen. Mikroorgan. v. Kolle and Wassermann.)
- 4) Borcaro, Clinical notes on Mycetoma. (Nat. Hist. Soc. Bombay. 1894.)
- 5) Blanchard, Sur le champignon du Mycetoma à grains noirs. (Bull. de méd. 1902. 35—48, 57—60.)
- 6) Bruas, Pied de Madura à grains noirs observé à Madagascar. (Ann. hyg. et méd. col. Paris. T. 6. 1903. p. 602.)
- 7) Bouffard, Mycetoma à grains noirs en Afrique. (Ann. di hyg. et méd. col. T. 8. p. 579—590.)
- 8) Brumpt, Les mycetoma. (Archiv. de Parasitol. T. 10. 1905. p. 489.)
- 9) —, Sur le mycétome à grains noirs. (Compt. Rend. Soc. d. biolog. Paris. T. 58. 1905. p. 997.)
- 10) — Mycetoma à grains noirs. (Arch. d. parasitol. 1902. p. 5, 151, 460.)
- 11) Carter, C. H., On mycetoma or the fungus diseases of India. London 1874.
- 12) Clemow, Mycetoma in the Yemen. (Brit. med. Journ. 1906. T. 1. p. 908.)
- 13) Cunningham, Is Mycetoma pirmary owing to the action of the fungal elements ordinarily associated with its product. (Scientif. Memoirs med. Officers India. T. 9. 1895. p. 67.)
- 14) Kanthack, Madura disease of head and foot. (Lancet. 1892. Jan. 23 and July 16; Journ. of Path. and Bacteriol. 1892.)
- 15) Köbner, Demonstration eines Präparates von Madurafuß. (Berlin. klin. Wochenschr. 1891. p. 32. (Referred in Handb. d. pathogen. Mikroorgan.)
- 16) Laveran, Au sujet d'un cas de mycétoma à grains noirs. (Bull. acad. méd. Paris. 1902. 38, 47, 773.)
- 17) Wright, A case of Mycetoma. Madura foot. I. (Expt. Med. 1898. p. 3, 42.)

### Description of the plates.

#### Plate I.

Fig. 1. Section of a piece of tissue removed from the growth shown in Plate II, Fig. 1. Stained by Haemotoxylon. Magnification 350. The fungoid element black in color is seen in the depth of the tissue.

Fig. 2. Shows the appearance assumed by the granules removed from the affected tissue when placed in agar, after 4 days incubation at 37° C. The figure (a) shows the front view of the growth and (b) the side view. The growth is raised from the surface of the agar and is spherical in shape. There is no tendency to spread. The radiating hairy structures can be seen growing from the colonies. The agar is tinged a little black around the growth.

Fig. 3. A portion of a colony removed from the wall of broth culture of black Mycetoma, stained by Iron — haemotoxylon—showing the branching mycelium.

#### Plate II.

Fig. 1. Showing the black Mycetoma tumour occupying the plantar surface of the leg. The several sinuses occupying the surface of the tumour are seen containing black granules. The 2nd figure shows the leg after the tumour is removed.

*Nachdruck verboten.*

## Ueber protozoenähnliche Gebilde des Blutes.

[Mitteilung aus der VII. ärztlichen Abteilung des St. Stephan-Spitals zu Budapest (Oberarzt: Dr. Karl Hochhalt, Privatdozent).]

Von Dr. **Emil Kőrmöczy**.

Seitdem die mikroskopische Untersuchung des Blutes Gemeingut der ärztlichen Diagnostik wurde, und seitdem wir wissen, daß die Protozoen mit manchen Krankheiten in ursächlichem Zusammenhang stehen, sucht eine ganze Schar von Forschern in dem Blute und dem Gewebssafte nach den zurzeit noch unbekannten Protozoen mancher Infektionskrankheiten. Mit vieler Mühe, aber meist erfolglos! Und das ist auch gar nicht zu verwundern, denn es gibt eine ganze Menge von Gebilden, welche den Forscher irreführen, und mit deren Natur und Beschreibung nicht einmal unsere größeren hämatologischen Werke sich beschäftigen. Diesem Mangel will ich wenigstens zum Teil mit meiner gegenwärtigen Abhandlung abhelfen, indem ich diese irreführenden Gebilde aufzähle und in großen Zügen beschreibe. Die Beschreibung muß in einzelnen Fällen wegen Platzmangels und leichterer Uebersicht kurz gefaßt werden; aber statt dessen werde ich die sich mit diesen irreführenden Gebilden befassende Literatur aufzählen, in welcher man die genaue Beschreibung und Erklärung finden kann!

Die Beschreibung und Erklärung dieser Gebilde wird dann viel leichter sein, wenn wir vorerst das gefärbte, und zweitens das native Präparat zum Gegenstand unseres Studiums machen.

### I. Täuschungen bei der Untersuchung gefärbter Präparate.

Wir wenden heutzutage bei der Suche nach Protozoen am häufigsten „Giemsa“ an; deshalb werde ich auch besondere Rücksicht auf dieses Färben nehmen.

Unter diesen Umständen fallen gleich jene Gebilde fort, welche nur die Folgen des die Zellen auflösenden, fixierenden und färbenden Verfahrens sind [z. B. Löwit (25) Hämamöbe], weil bei dem Färben mit Giemsa, wenn demselben eine Alkoholfixation vorangegangen ist, solche Kunstgebilde, natürlich bei vorsichtigem Aufstreichen, nicht vorzukommen pflegen.

Um so häufiger hingegen sind die Farbniederschläge. Diese aber sind sehr leicht erkennbar, wenn in Betracht gezogen wird, daß sie im ganzen Präparate vorkommen, daß sie sich auch auf die Zellen legen und, was am wichtigsten ist, daß sie in gut abgewaschenen Präparaten nur sehr vereinzelt vorkommen. Aber zuweilen sehen wir so seltsame Farbniederschläge, welche wohl imstande sind, den unerfahrenen Forscher zu täuschen. Dies sind kleine, runde, sich metachromatisch färbende Niederschläge einer alten oder verdorbenen Giemsa-Lösung, die ein lichtblauer Hof umgibt. Dieser Hof ist um den Farbkern herum am dunkelsten, und wird gegen den Rand zu immer lichter. Die Peripherie des Gebildes ist nur äußerst selten kreisrund, meistens zackenförmig und mit Fortsätzen besetzt. Das Abspülen des Präparates durch sehr verdünntes essigsäures Wasser, oder ein anderes

Färbungsverfahren erteilt uns in diesem Falle raschestens den nötigen Fingerzeig.

Die in dem gefärbten Präparate leicht irreführenden Gebilde können innerhalb der roten und weißen Blutkörperchen und zwischen den Zellen vorkommen.

Zwischen den sich mit sauren Farben färbenden Gebilden der roten Blutkörperchen und zwischen den Protozoen existiert offenbar keine Ähnlichkeit. Solche azidophile Gebilde sind: „die hämoglobinämischen Innenkörperchen“ [Ehrlich (6b)], und die während einer Malaria in den roten Blutzellen bemerkbaren roten Tüpfelungen [Tüpfelung, Maurer (27), Schüffner (45)].

Die im Innern der Erythrocyten vorkommenden basophilen Körnchen sind so allgemein bekannt, daß ich sie am besten gar nicht erwähne. Obzwar eine zu ihnen gehörende, wenn auch nur höchst selten vorkommende Art ganz erstaunlich den Protozoen gleicht. Wenn nämlich in der Mitte eines größeren basophilen Körnchens ein rotes Chromatinstäubchen ist, welches letzteres kleines Gebilde augenscheinlich ein Kernrest ist. Ich persönlich habe derartige Gebilde niemals gesehen, und ich kenne sie nur aus Ferratas (15) Abbildungen.

Außer den basophilen Granulationen beschreibt Lazarus (22) (4. Tafel) in seinem Buche auch azurophile Granulationen, ungefähr in der Größe der Basophilkörnchen, mit denen sie angeblich zusammen vorkommen sollen. Unter den endoglobulären Gebilden von roten Blutkörperchen verursachen diejenigen verhältnismäßig die größten Schwierigkeiten, welche wahrscheinlich die Ueberreste des verschwindenden Kernes und der Kernmembranes sind. Von solchen sind mehrere Arten bekannt. Am größten sind diejenigen, welche aus dem Auseinanderfallen des piknotischen Kernes herrühren. Dies sind rote Klümpchen (Giemsa-Färbung), in denen die Struktur des sich auflösenden Kernes meistens noch mit gutem Auge und Mikroskop zu erkennen ist. Zuweilen hängen diese Klumpen noch mit dem Kerne zusammen, in anderen Fällen aber ist der Kern schon nicht mehr sichtbar. Ein oder mehrere sind in einer Zelle und gewöhnlich in der Peripherie. Wir können diese häufig genug im embryonalen Blute, im Knochenmark und auch im Blute Erwachsener, bei starker Regeneration, bemerken.

Vollkommen strukturlos und auch etwas kleiner, aber noch immer die rote Färbung annehmend (Giemsa), sind die Jolly (18)-Howellschen (17) Körperchen. Diese sind durchschnittlich  $0,2-0,3\ \mu$  groß und 1—2 in einer Zelle, und zwar gewöhnlich an der Peripherie derselben. Es sind dies kleine, kugelige, sich ins Azurene metachromatisch färbende, runde Gebilde, welche ich meinerseits wenigstens immer mit basophilen Körnchen gemischt bemerke. Bei schwacher Giemsa-Lösung sind sie nicht bemerkbar, aber mit May-Giemsa-Pappenheim sind sie mit erstaunlicher Leichtigkeit und zuweilen in frappierender Anzahl zu sehen. Dies sind jene Gebilde, mit denen man sich in der hämatologischen Literatur bereits so viel befaßt hat, und die zu so viel Irrtümern Veranlassung gegeben haben [Schmauch (42), Bloch (3), Morris (31), Dehler (7), Weidenreich (49) (ausführliche Literatur) usw.]. Die Forscher entdeckten sie gewöhnlich im Tierblute, im menschlichen Blute hingegen aber nur selten. Aber wie bereits erwähnt, kann man diese Körperchen bei starker Giemsa-Lösung fast in jeder schwereren Blutalteration finden.

Viel kleiner als die genannten Gebilde, und mit Giemsa blau sich färbend, sind jene kleinen Kokken oder diplokokkenartigen Gebilde, welche zuweilen ganze Ketten bilden, und welche nach der heutigen Auffassung ebenfalls als Kernreste zu betrachten sind. Sie liegen gewöhnlich in dem peripherischen Teil der Zelle, ein lichter Hof umgibt sie, und sie können nur mit guter Immersion und 8—12-er Okular gesehen werden. Diese Gebilde beschrieb, wie mir bekannt, zu allererst Nissle (32); er hielt dieselben für ruhende Formen der Flagellaten, aber später faßte auch er sie richtig auf. Weidenreich (49) nennt sie Chromatinstäubchen, und hält sie für Kernreste. Wahrscheinlich sah auch Plehn (38) diese Gebilde in dem Blute tropischer Malariakranker, und hielt sie irrtümlich für Dauerformen der Plasmodien (obwohl auch er sie vorsichtshalber bloß karyochromatophile Körner nennt). Nach all diesen sind die von Grawitz und Grünberg (13), ferner von Schrötter (43) in ultraviolettem Lichte gesehenen Körnchen ebenfalls mit diesen Gebilden identisch.

Mit diesen Gebilden zusammen oder auch ganz von ihnen unabhängig sehen wir kleine, rot sich färbende (Giemsa), fadenartige Gebilde in den roten Blutzellen mancher Anämischen. Diese fadenartigen Gebilde sind zuweilen länger und bilden dann einen Kreis oder Achter, in anderen Fällen nehmen sie andere bizarre Formen an. Sehr selten sind diese Gebilde extraglobulär. Mir ist auch schon eine solche Art vorgekommen, wo der den kleinen Kreis bildende Faden in kleine, blaue Teilchen zerfallen ist. Unter den blauen Teilen waren auch hier und da solche, die ins Azurfarbene spielen, und so das Ganze den Ringformen des Malaria plasmodiums äußerst ähnlich machten. Diese Schlingen beschrieb zuerst Cabot (5, 1903), seitdem aber Schleip (40), Naegeli (22), Gabriel (11), Sluka (41) u. a. mehr. Bei stärkerer Giemsa-Färbung sehe ich jetzt diese Gebilde schon fast bei jeder schwereren Anämie, nämlich seitdem ich sie suche. Diese Gebilde werden für die Reste der Kernmembran der roten Blutkörperchen angesehen, aber meiner Ansicht nach bedarf diese Frage noch weiterer gründlicher Untersuchung.

Während die von mir hier genannten endoglobulären Gebilde strukturlos sind (die größeren Kernbröckel ausgenommen), haben die jetzt zu beschreibenden, wenigstens bei gewisser Farblösung, eine ganz entschiedene Struktur. Dies sind jene endoglobulären Gebilde (Nukleoid, Binnenkörperchen, Innenkörperchen, endoglobuläre Blutplättchen), welche gegenwärtig mit den Blutplättchen, und zwar meiner Ansicht nach mit vollster Berechtigung, in Zusammenhang gebracht werden. Diese endoglobulären Gebilde kommen am häufigsten einzeln, und nur selten zu mehreren in einer Zelle vor, und haben meistens eine periphere und nur selten eine zentrale Lage. Bei starker Giemsa-Färbung erscheinen sie matt azurblau gefärbt, von einem lichten Hof umgeben. Ihre Struktur ist zumeist nicht gut erkennbar. Höchstens ist zu bemerken, daß des Körperchens Grundsubstanz schwach rosafarben oder ganz farblos ist, und in diese kleine, azurfarbene Körnchen gebettet sind, welche sich kernartig zusammenballen. Aber von einer wirklichen Kernstruktur keine Spur! Ein ganz anderes Bild erhalten wir, wenn wir das Präparat ganz dünn und ein wenig gepreßt ausbreiten, oder wenn wir statt Alkohols mit Aetheralkohol fixieren, oder ohne alle diese Prälimi-

narien, wenn wir nur schwächer färben. In diesen Fällen nehmen die farblosen Körper des Gebildes himmelblaue Farbe an, und in dieser erscheinen die rötlichen Azurkörnchen ganz besonders deutlich. Unter gewöhnlichen Umständen wird wohl heutigen Tages niemand mehr dieselben mit den Protozoen verwechseln, und Irrtümer können daher nur ausnahmsweise vorkommen.

In den weißen Blutzellen sehen wir protozoenartige Gebilde schon viel seltener als in den roten Blutzellen, obzwar auch hier gewisse Gebilde vorkommen können, wo zuweilen Zweifel aufgetaucht sind, ob sie nicht ebenfalls Protozoen seien. Während wir aber im allgemeinen bei den Gebilden der roten Blutzellen als erwiesen annehmen, daß sie aus den Kernen der roten Blutzellen, eventuell aus der die Kerne umgebende Membran stammen, und höchstens über die Details des Prozesses nicht im klaren sind, deckt die Herkunft solcher Gebilde der weißen Blutkörperchen bis zum heutigen Tage noch volles Dunkel. Es ist überaus schwierig, innerhalb des Rahmens meiner Abhandlung eine genaue Beschreibung dieser Gebilde zu liefern, und denjenigen, die sich damit eingehender befassen wollen, sei die Lektüre der Originalwerke empfohlen, die ich hier gleich kurz nennen will. Vor allem sei der Kurloffschen (20) Körperchen Erwähnung getan, die auch unter gewöhnlichen Umständen in den granulationslosen, einkernigen, großen Zellen des Meerschweinchens zu sehen sind. Vakuolenartige Gebilde, die er aber nicht färben konnte, beschreibt noch Guyot (12); sie kommen seiner Ansicht am ehesten bei infektiösen Krankheiten vor. Derartige Vakuolen sah ich übrigens auch häufig in dem Blute der Leichen, und in den weißen Blutzellen veralteter Exsudate. Sie stimmen vollständig mit jenen überein, welche Schleip in seinem Atlas (Taf. VIII, Fig. 15) abbildet. Am häufigsten sind mehrere in einer Zelle und an der Zellenperipherie postiert, häufig sind auch deren Konturen vorgewölbt. Es kann auch vorkommen, daß im Innern der einen oder der anderen weißen Blutzelle phagocytierte Blutplättchen sichtbar sind [Heim-Preisch (39)], und daß dies eventuell einen protozoenartigen Eindruck machen kann. Protozoenartige Gebilde fand übrigens in weißen Blutzellen auch Michaelis (30), ferner Pappenheim und Hirschfeld (35). Diese Gebilde sind wesentlich abweichend von jenen, welche Wechselmann und Hans Hirschfeld (48) bei fast einem jeden weißen Blutkörperchen einer akuten myeloiden Leukämie fanden, anscheinend sah eben diese Gebilde May (28) in den polynukleären Zellen einer 24-jährigen, an einer mäßigen, sekundären Anämie Leidenden. Uebrigens waren diese Gebilde auch in den eosinophilen und Mastzellen sichtbar. Mit Giemsa färben sie sich blau, bei Methylgrün-Pyroninfärbung aber rot. Mit Triacid konnte man sie nicht färben, bei Hämatoxylinfärbung hingegen waren sie deutlich erkennbar, die „Glykogenreaktion (mit Jodgummilösung) gaben sie nicht, und zuweilen waren auch ihrer 4 in einer Zelle, hauptsächlich in der Peripherie. Diese eigentümlichen Gebilde der weißen Blutzellen hielt kein einziger Autor für Protozoen, nur Pappenheim (35) befaßte sich mit diesem Gedanken in seiner ersten Arbeit, später aber hielt auch er es für unwahrscheinlich.

In den gefärbten Präparaten kommen protozoenähnliche Gebilde auch extraglobulär vor, und zwar kann eigentlich jedes intraglobuläre Gebilde auf natürlichem oder noch viel eher auf gewaltsamem Wege die Zellen verlassen und auch zwischen denselben sich plazieren. Wie bereits erwähnt, geben zu den häufigsten Täuschungen außer den Farb-

niederschlagen noch die aus den Zellen herausgelangten Cabotschen Ringe und die „Innenkörperchen“ Veranlassung. Außer weiteren kennzeichnenden Eigenschaften sind die Ringe auch daran erkennbar, daß gewöhnlich die Reste des Zellkernes in ihrer Nähe sind. Die Innenkörperchen (Blutplättchen) können aber in gewissen Fällen viel Verwirrung anrichten. Wir finden in ihrer Nähe natürlich schon deshalb sehr häufig keine Mutterzelle mehr, weil sie noch vor dem Austrocknen im Plasma sich bewegten, aber auch deshalb nicht, weil sie aus der Zelle wahrscheinlich ohne deren Zerquetschung heraustreten können. Ein ganz besonderes Uebel verursachen sie dann, wenn bei dünn ausgebreitetem Präparate ihre plasmatischen Teile sich blau färbten und sich Fortsätze bildeten. In solchen Fällen kann sich nur derjenige zurechtfinden, dem die Gebilde schon vorher gut bekannt waren. In zweifelhaften Fällen leistet auch eine starke Giemsa-Färbung gute Dienste. Bei starker Giemsa-Lösung färbt sich nämlich das Gebilde matt-azur, die in der Mitte unregelmäßig zusammengeballte Gruppe der azurfarbigen Körnchen erscheint deutlich, die plasmaartigen Teile hingegen verschwinden. Bei Protozoen aber erscheint die blaue Plasmafärbung in diesem Falle nur um so mehr, und der rote Kern hebt sich aus derselben scharf hervor. Aber ganz besonders erwähnt und betont sei ein ganz eigenartiges Gebilde, auf welches meines Wissens bisher noch nicht aufmerksam gemacht wurde. In dem bläulichen Plasma der einkernigen weißen Blutzellen sind azurfarbene Körnchen, und das Plasma dieser schnürt sich während des Präparierens häufig ab. Dann sind in diesem Falle zwischen den Zellen kleine, runde und ovale, blaugefärbte mit Azurkörnchen versehene Gebilde sichtbar. Hier verstärken wir umsonst die Giemsa-Färbung, die wird diese Gebilde, welche den Hämatoozen außerordentlich gleichen, nur um so mehr hervorheben. Ich persönlich hatte einen Fall, wo mich diese Gebilde durch Tage in Aufregung erhielten, bis ich auf ihren Ursprung kam, indem ich 1—2 sich gerade aus dem Lymphocytenplasma sich loslösende, runde Gebilde entdeckte<sup>1)</sup>.

## II. Täuschungen bei Untersuchung der nativen Präparate.

Wir untersuchen die nativen Präparate des Blutes gewöhnlich deshalb, um die Bewegung des gesuchten Protozoons zu beobachten; denn zur Entscheidung der morphologischen Fragen benutzen wir lieber gefärbte Präparate. Es ist daher angezeigt, wenn ich gleich zu Anfang betone, daß nicht all das „Contagium vivum“ ist, was sich im frischen Blutpräparat bewegt. Eine ganze Gruppe von intra- und extracellulären Gebilden besitzt in dem nativen Blutpräparate selbständige Bewegung.

Wir sehen derartige sich bewegende Gebilde in dem Innern der weißen Blutzellen nicht. Das hier und da bemerkbare oszillierender

1) Eben dieselben Gebilde beschrieb seitdem auch Ferrata (Refer. Fol. Haemat. 1910. p. 339) und hält sie irrtümlich für Blutplättchen. Aus den über dieses Referat gemachten Bemerkungen ersehe ich, daß Mayer diese Gebilde ebenfalls bemerkte, und auch er sie für abgeschnürte Teilchen der Lymphocyten hielt (Arch. f. Tropenhyg. 1908. Beiheft).



Granulationen ist weniger auffallend und auch sonst nicht zu verwechseln. Aber in dem Innern der roten Blutkörperchen bemerkten wir des öfteren kleine, sich rasch hin- und herbewegende Gebilde. Die Größe dieser Gebilde variiert von Punkt- bis 2- $\mu$ -Größe. Ihre Gestalt ist zumeist kreisrund, zuweilen aber, besonders wenn wir bei der Auseinanderbreitung des Blutes Gewalt anwenden, Fortsätze tragend. Das Gebilde selber ist stark lichtbrechend und blaß, von einem hämoglobinarmlen Hof umgeben. Gewöhnlich ist eins, manchmal aber auch zwei in einer Zelle. Mit einem guten Immersionsmikroskop und einem 8—10er Okular bewaffnet, kann sie das geübte Auge sehr leicht entdecken, wie sie sich in rascher, um sich selbst drehender Bewegung auf der Peripherie der Zelle bewegen. Viele bemerkten auch an den Fortsätze tragenden Gestalten flitterartige Bewegungen; ich für meinen Teil konnte derartiges niemals deutlich erkennen. Bei Dunkelfeldbeleuchtung sind diese Gebilde viel deutlicher erkennbar, und da sieht man in ihrem Inneren 1—2 lichtere, kernartige Gebilde. Im Blute der gesunden Menschen sind die eben beschriebenen Gebilde nur äußerst selten sichtbar, viel eher aber bei Anämieen, bei infektiösen Krankheiten oder nach akuten Blutverlusten. Ein äußerst wichtiger Wegweiser ist der Umstand, daß die die Gebilde enthaltende Zelle nicht pigmenthaltig ist, und daß sie um gar nichts blässer ist, als die übrigen roten Blutkörperchen des Blutes. Im kranken Blute kann es allerdings vorkommen, daß die das Gebilde enthaltende Zelle ebenfalls hämoglobinarml ist, doch hier können wir dann auch andere blasse Zellen ohne Gebilde finden.

Es hält sehr schwer, zu bestimmen und zu entscheiden, was eigentlich diese kleinen, im nativen Präparate sich bewegenden Gebilde sind, und was ihnen im gefärbten Präparate entspricht. Nur 2 Gebilde können in Betracht kommen, die Jolly-Howellschen, sich mit Giemsa rot färbenden, kugelartigen Gebilde und die Innenkörperchen. Jener Umstand, daß bei Dunkelfeldbeleuchtung ein kernartiges Gebilde in ihnen sichtbar wird, spricht für die Wahrscheinlichkeit letzterer Voraussetzung. Den Umstand hingegen, daß wir bei den stark mit Giemsa gefärbten Blutpräparaten fast in jedem Sehfelde Innenkörperchen finden, während wir bei frischen Präparaten in den roten Blutkörperchen solche sich bewegende Gebilde nicht bemerken, läßt sich schwer erklären. Es ist möglich, daß das Fixieren und Färben des Blutpräparates ihre Fähigkeit, sich dem Auge bemerkbar zu machen, fördert, während bei frischen Präparaten sie nur dann erscheinen, wenn sie infolge irgendeiner Veranlassung sich zu bewegen anfangen. Auf jeden Fall muß diese Frage noch gründlich studiert werden, und gegenwärtig traue ich mir noch keineswegs, darüber etwas Bestimmtes auszusprechen.

Während wir in den roten Blutzellen intracelluläre, sich bewegende Gebilde nur sehr selten und nur in sorgfältig und dünn auseinander gebreiteten Präparaten finden, machen hingegen die extraglobulären, sich bewegenden Gebilde in dem nachlässig bereiteten, nativen Präparate die gewöhnlichen Bestandteile aus. Uebrigens kommen extraglobuläre, sich bewegende Gebilde auch in sorgfältig hergestellten Präparaten vor, wie z. B. bei Anämieen, Fiebern, Blutgiftanämieen, und was ich bei meiner gegenwärtigen Abhandlung besonders betonen will, auch in dem Magen der blutsaugenden Insekten. Dies habe ich öfters schon beobachtet, und neuerdings haben auch andere [Swingh (47)] darauf aufmerksam gemacht.

Die Beschreibung dieser sich bewegenden Gebilde und die Erörterung ihrer Herkunft ist sehr schwer. Nicht nur deshalb, weil sie äußerst verschiedener Gestalt, sondern auch darum, weil sie von sehr abweichender Abstammung sind. Es ist im allgemeinen anzunehmen, daß alles das, was durch Zerbröckelung oder Hinausgestoßenwerden der intracellulären Teilchen in das Blutplasma gelangt, unter gewissen, günstigen Bedingungen beweglich wird, und die Zahl der jetzt in Untersuchung befindlichen extracellulären Gebilde vermehrt. Denn die Bewegung, die wir an ihnen bemerken, stammt von solchen chemischen und physikalischen Bedingungen [Michaelis (29)], welche nicht so sehr von ihnen, als von den sie umgebenden Verhältnissen abhängen. Unter solchen Umständen muß ich mich damit begnügen, unter diesen Gebilden nur die gewöhnlichsten herauszuwählen und zu beschreiben.

Die am meisten augenfälligen und die am längsten bekannten unter all diesen extraglobulären Gebilden sind diejenigen, welche Ehrlich als Schistocyten beschreibt. Diese stammen aus der Abbröckelung der Plasmateile der roten Blutkörperchen und führten durch ihre lebhaft bewegung schon viele Forscher [Klebs (19), Perles (37)] auf Irrwege, und wurden eben deshalb von Hayem (13) Pseudoparasiten genannt.

Diese Schistocyten sind in dem gesunden Menschenblute niemals sichtbar, sondern nur dann, wenn bei der Herstellung des nativen Präparates nicht mit der nötigen Sorgfalt vorgegangen wurde. Zum Beispiel wenn die Gläser angelaufen waren oder wenn Epithelteilchen ins Blut gelangt waren usw. Aber in den letzteren Fällen finden wir sie nur äußerst selten. Jedoch nicht mehr so, wenn die Blutzellen fragil geworden sind. Z. B. bei Anämieen, bei Einwirkung von Blutgiften, oder bei Hämaturieen (im blutigen Urin), auch in dem im Magen befindlichen Blute der blutsaugenden Insekten usw. In solchen Fällen ist zum Teil schon vor der Auseinanderbreitung des Blutes die Fragmentation der Zellen vorhanden, zum Teil aber kann auch die vorsichtigste Auseinanderbreitung dies hervorrufen. In solchen Fällen sind 1—3  $\mu$  große, lichtbrechende, ihre Form fortwährend ändernde, sich lebhaft bewegende Gebilde zwischen den ruhenden Zellen zu sehen. Die Gebilde folgen zwar zumeist der Strömung des Blutplasmas, aber man kann trotzdem ganz gut bemerken, daß sie nicht bloß passive Bewegung besitzen, sondern daß sie, um ihre eigene Achse sich drehend, sich auch dann noch bewegen, wenn die Strömung des Plasmas anscheinend wenigstens bereits aufgehört. Für diese Gebilde ist ihr Hämoglobingehalt charakteristisch, der besonders gut bemerkbar ist, wenn das Präparat austrocknet und die Bewegung der Gebilde aufhört. Da sehen wir sie zwischen den Fibrinfäden als Mikrocyten wieder. Ja sogar die für das Plasma der roten Blutkörperchen so charakteristische Delle erkennen wir darauf. Zuweilen verändern sich diese kleinen Teilchen und machen den Eindruck von Mikropoikilocyten. Alle diese Erscheinungen sind so augenfällig und so deutlich erkennbar, daß all das, was die Resistenz der Blutkörperchen verringert, und die Fragmentation befördert, diese Gebilde vermehrt, so daß wir tatsächlich über den Ursprung derselben nicht im unklaren sein können. Diesbezüglich dienen übrigens auch die Experimente von Arnold (2), Maragliano (26) u. a. mehr als Stützpunkte. Als ganz unhaltbar erweist sich Löwits (24) Auffassung, daß diese aus dem Austritt des Innenkörperchens stammen.

Ein anderes, sich bewegendes, aber nicht mehr so leicht zum Vorschein kommendes extracelluläres Gebilde ist das aus dem roten Blutkörperchen herausgetretene Innenkörperchen. Dies sind hämoglobinlose, 2—4  $\mu$  große, mit kleinen kernähnlichen Gebilden versehene Körperchen, die zuweilen mit Fortsätzen versehen sind und manchmal sich flitternd bewegen. In neuerer Zeit habe ich mich viel mit der Untersuchung dieser Gebilde befaßt, und habe mich davon überzeugt, daß bei gesundem Menschenblute und bei vorsichtigem Präparieren sie verhältnismäßig selten sichtbar sind. Die verspätete Aufarbeitung des Bluttröpfens hingegen oder die Anwendung von ein wenig Gewalt bei fragilem Blute fördert ihr Entstehen. Ich will deshalb noch nicht behaupten, daß das sich bewegende Blutplättchen immer von der Fragilität des Blutes oder der Anwendung von Gewalt zeugt. Aber auf jeden Fall fördern diese zwei Faktoren ihre Wahrnehmbarkeit im frischen Präparate. Bei Dunkelfeldbeleuchtung erscheinen die Gebilde deutlicher und wird ihr kernartiger Mittelpunkt auch deutlicher erkennbar. Es erscheint begreiflich, daß unter gewöhnlichen Umständen diese Gebilde den Protozoen sehr ähneln und zu Täuschungen [Achard und Aynaud (11), Larrier (21), Tagnier (33), Schwalbe (46), Wright (50)] Veranlassung geben konnten.

Wie schwer es fällt, diese Gebilde systematisch geordnet zu beschreiben, so leicht wird es ihnen, uns zu täuschen, indem sie Protozoen ungemein ähneln. Deshalb ist es als Regel zu betrachten, derartige sich bewegende Gebilde nur in dem Falle als Protozoen agnoszieren zu dürfen, wie sehr sie auch sonst denselben gleichen mögen, wenn sie pigmenthaltig oder von diesen Gebilden an Form abweichend sind (Spirochaeta, Spirillum, Trypanosoma, Morula etc.) oder wenn anderweitige Anzeichen dieser Gebilde ihre Protozoennatur unzweifelhaft beweisen können.

Dies wären also in großen Zügen die den Blutprotozoen ähnelnden Gebilde. Es ist möglich, daß ich eines oder das andere unter ihnen zu erwähnen vergaß, aber jedenfalls ist ihre Anzahl auch so eine stattliche. Und noch viel größer ist ihre Zahl, wenn wir nicht das Blut, sondern das Reizserum untersuchen. Anlässlich solcher Untersuchungen kann nur eines uns auf die richtige Spur bringen, nämlich die gründliche Kenntnis der Protozoenmorphologie und das für die Untersuchung derselben bereits geübte Auge.

**Korrektur-Anmerkung.** Diese Abhandlung wurde noch im Anfange des vorigen Jahres geschrieben, deshalb sind die neuen (siehe Fol. Haemat. 1910—1911), mit diesem Thema sich befassenden Arbeiten nicht berücksichtigt.

#### Literatur.

- 1) Achard et Aynaud, *Forme et mouvements de globule de sang.* (Ref. Fol. Haemat. Bd. 5. 1903.)
- 2) Arnold, *Zur Morphologie und Biologie der roten Blutkörperchen.* (Virchows Arch. Bd. 145. Heft 1.)
- 3) Bloch, *Beiträge zur Hämatologie.* (Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 43. 1901.)
- 4) Bodon, *Die morphologischen und tinktoriellen Veränderungen der nekrobiotischen Blutzellen.* (Virchows Arch. Bd. 173. 1903.)
- 5) Cabot, *Journ. of med. Research.* Vol. 9. 1903. No. 15. (Bei Löwit erwähnt.)

- 6) Cesaris-Demel, Beobachtungen über das Blut. (Fol. Haemat. IV. Suppl. 1. 1907.)
- 6a) — —, Von einem in den einkernigen Leukocyten des Meerschweinchens eingeschlossenen Körper. (Verhandl. der italien. Pathol. Gesellsch. 1905. April. Ref. Fol. Haemat. Bd. 3. p. 365.)
- 6b) Ehrlich, Lazarus u. Pinkus Leukämie, Pseudoleukämie, Hämoglobinämie. 150 p. 2 Taf. 2 Fig. Wien 1901.
- 7) Dehler, bei Nissle (32) erwähnt.
- 8) Ferrata, Virchows Arch. Bd. 181. 1907.
- 9) — —, Fol. Haemat. IV. Suppl. p. 33.
- 10) — —, Ueber die klinische und morphologische Bedeutung der vital färbbaren Substanzen usw. (Fol. Haemat. Bd. 9. 1910. Heft 2. 6 Taf.)
- 11) Gabriel, Ueber Ringkörper im Blute Anämischer. (Dtschs Arch. f. klin. Med. Bd. 92. 1908.)
- 12) Guyot, Ueber gewisse Degenerationsformen der Leukocyten. (Ref. Fol. Haemat. Bd. 3. p. 366.)
- 13) Grawitz u. Grünberg, Die Zellen des menschlichen Blutes im ultravioletten Lichte. Leipzig 1906.
- 13a) Hayem, Du sang. Paris 1889.
- 14) Heinz, Ueber Blutschädigungen und deren Folgen. (Verhandl. d. Pathol. Gesellsch. Bd. 2. 1900.)
- 15) — —, Blutgiftanämieen.
- 16) Hirschfeld, Virchows Arch. Bd. 166. p. 195.
- 17) Howel, The life-history of the formed elements of the blood etc. (Journ. of morph. Vol. 4. 1891. [Bei Cesaris-Demel erwähnt.])
- 18) Jolly et Vallée, Sur les corpuscules de Schmauch etc. (Société de Biol. 1906. Nov. 3. Ref. Fol. Haemat. 1907. Suppl. p. 316.)
- 19) Klebs, XI. Kongr. f. inn. Med. [Diskussion.]
- 20) Kurloff, Ehrlich, Anämie. Bd. 1. 1898. p. 57.
- 21) Larrier, Sur quelques variétés morphologiques des Haematoblast. (Ref. Fol. Haemat. 1908. p. 788.)
- 22) Lazarus-Naegeli, Die Anämie. Teil I.
- 23) Ledingham, On the vacuolated mononucleus cells in the blood of the guinea-pig. (Lancet. 1906. June 16. Ref. Fol. Haemat. 1906. p. 365.)
- 24) Löwit, Ueber die Membran und die Innenkörper der Säugetiererythrocyten. (Zieglers Beitr. Bd. 42. 1907.)
- 25) — —, Die Leukämie als Protozoeninfektion. 1900.
- 26) Maragliano u. Castolino, Zeitschr. f. inn. Med. Bd. 21. p. 415.
- 27) Maurer, Zeitschr. f. Biol. Bd. 28. 1900.
- 28) May, Leukocyteinschlüsse. (Dtschs Arch. f. klin. Med. Bd. 46.)
- 29) Michaelis, Ueber die Ursachen der amöboiden Beweglichkeit. (Fol. Serol. Bd. 2. Heft 5.)
- 30) — —, Verhandl. d. Berl. med. Gesellsch. 1900. p. 24.
- 31) Morris, Note on the occurrence of Howell's nuclear particles etc. (Bull. of the John Hopkins Hospit. 1907. p. 198. Ref. Fol. Haemat. 1907. Suppl. p. 317.)
- 31a) — —, Nuclear particles in the erythrocyt. (Arch. of intern. Med. 1909. March. Ref. Fol. Haemat. Bd. 8. p. 244.)
- 32) Nissle, Beobachtungen an Blut mit Trypanosomen geimpfter Tiere. (Arch. f. Hyg. Bd. 53. 1905. Heft 3.)
- 32a) — —, Ueber Centrosomen und Detlersche Reifen in kernlosen Erythrocyten. (Ibid. Bd. 61. Heft 2.)
- 33) Pagniez, Aperçu sur l'état actuel de la question des paquettes sanguines. (Arch. d. malad. d. cœur, d. vaisse. et d. sang. T. 1. 1900.)
- 34) Pappenheim, Demonstration von Blutplättchen. (München. med. Wochenschr. 1906.)
- 35) — —, Fol. Haemat. IV. Suppl. No. 1. p. 46.
- 35a) — —, ibid. Bd. 6. 1908. p. 190; Bemerk. zu Dietrichs Abhandlung.
- 35b) — —, Ueber eigenartige Zelleinschlüsse bei Leukämie. (Berlin. klin. Wochenschr. 1908. No. 2 u. Fol. Haemat. Bd. 5. p. 361.)
- 35c) — —, Bemerkungen zu dem Referat von Patellas Arbeiten. (Fol. Haemat. 1908. p. 31.)
- 36) Pappenheim-Pröscher, Experimentelle Leukocytose. (Fol. Haemat. Bd. 1. p. 638.)
- 36a) — —, Fol. Haemat. Bd. 1. p. 687.
- 36b) Patella, Mikrochemie und leichenähnliche Zustände der Uninukleären des Blutes etc. (Riform. med. 1907. No. 8—9. Ref. Fol. Haemat. 1908. No. 31.)

- Ebendort (No. 31) mehrere mit diesen Fragen sich beschäftigende Arbeiten referiert.
- 37) Perles, Beobachtungen über perniziöse Anämie. (Berlin. klin. Wochenschr. 1891. No. 40.)
  - 38) Plehn, Ueber Tropenanämie und ihre Beziehung zur latenten und manifesten Malariainfektion. (Dtsche med. Wochenschr. 1899. No. 28 u. 30.)
  - 38a) Preisich-Heim, Altolanas Haematologia. Teil I. 1910. [Ungarisch.]
  - 39) Ruge, Dtschs Arch. f. klin. Med. Bd. 72.
  - 40) Schleip, Ueber Ringkörperchen im Blute Anämischer. (Dtsches Arch. f. klin. Med. Bd. 91. 1907.)
  - 41) Schluka, Schleifenbildung in polychromen und basophil gekörnten roten Blutkörperchen. (Dtschs Arch. f. klin. Med. Bd. 43.)
  - 42) Schmauch, Ueber endoglobuläre Körperchen in den Erythrocyten der Katze. (Virchows Arch. Bd. 146. p. 201.)
  - 43) Schrötter, Beitrag zur Mikrophotographie mit ultraviolettem Lichte nach Köhler. (Virchows Arch. Bd. 183. 1906.)
  - 44) Schur, Wien. med. Wochenschr. 1906.
  - 45) Schöffner, Dtschs Arch. f. klin. Med. Bd. 64—71.
  - 46) Schwalbe, Blut, Lymphe und Blutbildung. (Jahresber. üb. d. Fortschr. d. Anat. N. F. Bd. 10. 1904.)
  - 46a) — —, Die Blutplättchen etc. (Ergebn. d. allgem. Pathol. u. pathol. Anat. Bd. 8. p. 150.)
  - 46b) — —, Die Morphologie des Thrombus und die Blutplättchen. (Zieglers Beitr. Bd. 7. Suppl. I. p. 52.)
  - 47) Schwinge, Analogieen zwischen den Blutplättchen und Hämatozoen. (Journ. of Infect. 1908. Jan. Ref. Fol. Haemat. 1908. Heft 4. p. 124.)
  - 48) Wechselmann u. Hirschfeld, Ueber einen Fall akuter, myeloider, makrolymphocytärer Leukämie mit eigentlichen Zelleinschlüssen. (Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 66. p. 349.)
  - 49) Weidenreich, Die roten Blutkörperchen. I u. II. (Ergebn. d. Anat. u. Entwicklungsgesch. Bd. 13 u. 14. 1903 u. 1904.)
  - 49a) — —, Studien über das Blut und die blutbildenden und zerstörenden Organe. (Arch. f. mikrosk. Anat. Bd. 69. 1906.)
  - 49b) — —, Centrosomen oder Kernreste in den Erythrocyten des normalen strömenden Blutes. (Arch. f. Hyg. Bd. 63. No. 3.)
  - 50) Wright, Die Entstehung der Blutplättchen. (Virchows Arch. Bd. 136. 1906.)

*Nachdruck verboten.*

## Befunde bei Maul- und Klauenseuche.

[Aus dem Protozoenlaboratorium des Königl. Instituts für  
Infektionskrankheiten, Berlin  
(Direktor: Geh. Ober-Medizinalrat Prof. Dr. Gaffky;  
Leiter: Prof. Dr. Hartmann).]

Von Dr. **Huntemüller**, Assistenten des Instituts.

Mit 2 Tafeln.

Den Anstoß zu diesen Untersuchungen gab der Ausbruch der Maul- und Klauenseuche in meiner Heimat, der Provinz Hannover, im April dieses Jahres. Da die Seuche hier sehr bald einen großen Umfang nahm, stand mir Material in ausreichender Menge zur Verfügung.

Zur Untersuchung kam der Inhalt ganz frischer, noch nicht aufgebrochener Aphthen, die etwa 24 Stunden nach dem Beginn der Krankheitserscheinungen an Lippe und Zunge der Rinder auftreten. Die Entnahme geschah durch Einstich mit steriler Kapillare. Die Untersuchung fand möglichst bald nach der Entnahme, meist  $1\frac{1}{2}$ —2 Stunden später statt.

Als Schnittmaterial wurden die Zungen von jungen Ferkeln, die gleich nach dem Ausbruch der Blasen der Krankheit erlagen, in Sublimatalkohol und Flemmingscher Flüssigkeit fixiert. Auch hier gelang es mir, ganz frisches Material zu bekommen, so daß zwischen dem Tode der Tiere und dem Fixieren in Sublimatalkohol in einigen Fällen nur Minuten vergingen.

Die Untersuchung des frischen Aphtheninhalts geschah im hängenden Tropfen. Die Lymphe war sehr verschieden reich an roten und weißen Blutkörperchen und mehr oder weniger degenerierten Epithelzellen, manchmal fehlte aber dieser Inhalt. In allen Fällen fanden sich dagegen kleine Kugeln von Kokkengröße, die zum Teil im Innern einen stärker lichtbrechenden Punkt zeigten, und daneben kleine kugelige oder hantelförmige Gebilde an der Grenze der Sichtbarkeit (Zeiss' homog. Immers., Obj. 2 mm, Ok. 12). In einem Berkefeld-Filtrat fehlten zunächst die größeren Kugeln, während die zuletzt beschriebenen Gebilde in großer Zahl vorhanden waren. Auch als ein Teil des Berkefeld-Filtrates nach Prowazek durch ein Kolloidfilter geschickt wurde, fanden sich in dem Filtrerrückstande nur die kleineren Körperchen. Nach einigen Tagen, das Berkefeld-Filtrat hatte während dieser Zeit im Dunkeln bei Zimmertemperatur, 24° C, gestanden, ließen sich auch wieder größere Kugeln darin nachweisen. Um nun das Entstehen dieser Kugeln zu beobachten, benutzte ich einen heizbaren Objektisch. Diese Beobachtung gelang mir nicht. Dagegen konnte ich deutlich erkennen, wie in den größeren Kugeln ein stärker lichtbrechendes Korn auftrat, das sich dann in der Kugel herumbewegte. Nach kurzer Zeit zerfiel dieses in zwei Teile, die sich ihrerseits wieder teilten. Man konnte so nach einiger Zeit einzelne, zwei drei, vier, zuweilen auch mehr, stark lichtbrechende Punkte in ständiger Bewegung umeinander, von einem hellen Hof umschlossen, sehen. Wenn sich diese Körperchen voneinander losrissen, ließen sie sich nicht von den oben erwähnten, kleinen Gebilden unterscheiden.

Diese Befunde habe ich wiederholt auch bei unfiltriertem Aphtheninhalt gemacht. Hin und wieder fielen mir hierbei auch schon größere kreisartige Gebilde auf, in denen sich manchmal ein stark lichtbrechendes Körperchen befand. Ich hielt diese Gebilde zunächst für Blutkörperchenschatten, deren Größe sie fast erreichen, doch eine Beobachtung belehrte mich eines anderen. Wenn ich ein Präparat, in dem sich die oben beschriebenen Befunde auf dem erwärmten Objektische ausgebildet hatten, nach einigen Stunden lüftete, so traten diese Scheiben plötzlich in großer Menge auf, auch in Lymphe, die keine roten Blutkörperchen enthielt. Woraus sie entstehen, konnte ich bisher nicht feststellen. Ebenso plötzlich wie die Scheiben selbst tritt darin ein stark lichtbrechendes Körperchen auf, das sich in ständiger Bewegung befindet. Dieses teilt sich wiederum ganz plötzlich, und man sieht jetzt zwei von einem hellen Hof umgebene Kügelchen, ähnlich einem kleinen Kapseldiplococcus. Die Kügelchen reißen sich dann voneinander und rücken an zwei entgegengesetzte Pole der Scheibe, um sich hier wieder weiter zu teilen, und nach einiger Zeit sieht man, daß es sich hier nicht um eine Scheibe, sondern vielmehr um eine Kugel handelt, die an ihrer Oberfläche kleine, meist zu zweien liegende, von einem hellen Hof umgebene Körperchen aufweist, die munter darauf herumschwimmen. Diese Kugeln finden sich nach kurzer Zeit in großer Menge mit einem, zweien bis zu einer großen



**Zahl von Körperchen.** Diese reißen sich los und treten in die offene Flüssigkeit. Die Bewegung, die sie zeigen, ist jedenfalls nur starke Molekularbewegung.

Ähnliche Kugeln mit darin tanzenden Körperchen konnte ich bei einem Fall in verschiedenen Epithelzellen aus Aphtheninhalt nachweisen. Da ich die obenstehende Beobachtung noch nicht gemacht hatte, so glaubte ich, daß es sich um eingewanderte Leukocyten mit Granula handelte, wie ich es in Schnittpräparaten bei der Poliomyelitis beobachtet hatte, obwohl ich hier keinen Kern nachweisen konnte. Fixieren konnte ich diese Gebilde aus der Lymphe, wie auch die vorher beschriebenen leider nicht, obwohl ich es mit Eiweiß- und Gelatinezusatz versuchte.

Das gewonnene Schnittmaterial wurde nach Fixierung und Härtung in Alkohol durch kombinierte Celloidinparafinmethode eingebettet. Die Färbung geschah nach Heidenhain oder nach Romanowsky in der Schillingschen Modifikation. Um die im folgenden beschriebenen Gebilde darzustellen, müssen die Schnitte sehr stark differenziert werden; bei der Heidenhainschen Methode mit Eisenalaun, bei der Romanowsky-Färbung mit Alkohol. Das anatomische Bild der Maul- und Klauenseuche-Aphthen ist auf den Schnitten das gleiche, wie es die zu Kontrolluntersuchungen herangezogenen Brandblasen zeigen. Die Epithelzellen sind in ihrem Verbande gelockert, geschwellt und von einer großen Zahl Leukocyten umgeben. Die oberen Schichten sind als Blasendecke abgehoben, im Blasenlumen sieht man mehr oder minder reichlich aus ihrem Verbande gelöste Epithelzellen und Leukocyten.

Die fraglichen Gebilde liegen meist intracellulär einzeln und zu mehreren, von einem hellen Hof umgeben, der sich bei den frei in der Lymphe liegenden als helle, runde oder ovale Scheibe präsentiert. Die Körperchen selbst färben sich dunkel schwarz resp. blau, sind rund und von verschiedener Größe. Sie sind, wie man manchmal deutlich sieht, durch feine Fäden miteinander verbunden (Fig. 4). Der Zellkern ist in den Zellen meist noch gut erhalten, aber wegen der starken Differenzierung nur schwach gefärbt. Diese Bilder finden sich meist an der Grenze des aufgelösten Gebietes in relativ erhaltenen und in ihrem Verbande nicht gelockerten Zellen (Fig. 1—4).

In den aus ihrem Verbande gelösten und stärker geschwellten Zellen sieht man andere Gebilde. Bei einer bestimmten Einstellung der Mikrometerschraube haben sie Margueritenform, um ein rundes Zentrum gruppieren sich eine größere Zahl kleiner Punkte von verschiedener Größe, die um so kleiner werden, je mehr sie an Zahl zunehmen. Sie sind durch zarte Fäden miteinander verbunden, was darauf hindeutet, daß sie mit den eben beschriebenen Gebilden in ursächlichem Zusammenhang stehen. Bei etwas höherer Einstellung sieht man, daß es sich um eine Kugel handelt, die an ihrer Oberfläche kleine kugelige Körperchen trägt, die meist zu zweien liegen. In anderen Fällen hat sich ihr Verband gelockert, es zeigt sich alsdann ein mehr oder minder abgerundeter hellerer Körper, um den sich regellos eine Anzahl dunkler Punkte gruppieren (Fig. 5). Diese Befunde konnte ich in der Menge, wie sie die Abbildungen zeigen, nur an wenigen Präparaten erheben, bei anderen wurden erst nach langem Suchen derartige Gebilde gefunden.

In Präparaten von normalen Ferkelzungen und Brandblasen konnte ich sie niemals nachweisen.

Die Untersuchung der Schnittpräparate durch Aphthen von Ferkelungen haben also ganz ähnliche Befunde ergeben, wie ich sie in frischen Präparaten von Lymphe aus Aphthen der Rinder erheben konnte. Ich möchte daher diese Befunde für identisch halten.

Ob es sich bei diesen Gebilden um einen Mikroorganismus oder um irgendwelche Zelldegenerationen handelt, müssen weitere Untersuchungen lehren.

#### **Tafelerklärung.**

Fig. 1. Noch gut erhaltene Epithelzellen mit Einschlüssen; Schnitt durch die Blasendecke. (Zeiss' homog. Immers., Obj. 2 mm, Ok. 12.)

Fig. 2. Schnitt durch eine Papille, parallel der Oberfläche. (Zeiss' homog. Immers., Obj. 2 mm, Ok. 18.)

Fig. 3 und 4. Degenerierte Zellen mit freiliegenden und eingeschlossenen Körperchen, die häufig durch Fäden verbunden sind. (Zeiss' homog. Immers., Obj. 2 mm, Ok. 12.)

Fig. 5. Stark gequollene Epithelzellen mit Einschlüssen in Margueritenform. (Zeiss' homog. Immers., Obj. 2 mm, Ok. 12.)

*Nachdruck verboten.*

## **Observations microbiologiques et histologiques sur 80 cas de fièvre bilieuse hémoglobinurique.**

**Par le Dr. Jean P. Cardamatis,**

Professeur agrégé des maladies des pays chauds à l'Université d'Athènes.

### **A.**

Lors de l'assainissement des habitants de la ville Anchialos, réalisé l'année dernière, et dont j'avais été chargé par le Gouvernement et par la Ligue antimalarienne Hellénique, j'ai constaté 56 cas de fièvre bilieuse hémoglobinurique d'intensité diverse. A ce nombre, si on ajoute aussi 17 cas analogues empruntés à ma clientèle particulière l'année dernière, ainsi que 7 autres cas que j'ai observé avec le professeur Pezopoulos, nous avons en tout 80 cas de fièvre bilieuse hémoglobinurique et dont nous vous communiquons ici, en abrégé, les études faites par nous.

Sur ces 80 cas, il y en avait la moitié environ qui présentaient une forme grave avec des symptômes de polycholie et d'urémie représentant la forme clinique classique de la fièvre bilieuse hémoglobinurique grave. Parmi eux, il y a eu 6 décès seulement; par suite le rapport de la mortalité dans cette affection, à cause de notre traitement thérapeutique particulier s'élève seulement à 7,5 %.

J'ai examiné tous ces cas microbiologiquement et hématologiquement et je leur pris du sang, par intervalles, à compter dès l'apparition des premières urines noires comme il suit:

1° Sur 12 malades atteints de la dite affection j'ai pris le sang destiné à être examiné de 5 à 10 heures après l'apparition des urines noires et alors que l'accès de fièvre bilieuse hémoglobinurique durait encore.



Lisbeth Krause gez.

J. B. Obernetter, München, reprod.

*Verlag von Gustav Fischer in Jena.*



Huntemüller, Maul- und Klauenseuche.



2



3



4



5

Lisbeth Krause gez.

J. B. Obernetter, München, reprod.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Digitized by Google

Original from  
COLUMBIA UNIVERSITY





2° Sur 4 malades atteints de la même maladie j'ai pris le sang 32 heures après l'apparition des urines noires et alors que l'accès de fièvre durait encore.

3° Sur 10 malades j'ai pris le sang à examiner de 10 à 18 heures après l'apparition des urines noires.

4° Sur les 30 autres malades, qui souffraient de la fièvre bilieuse hémoglobinurique vers la fin de l'automne et pendant l'hiver, terme de la période fébrile, j'ai pris le sang destiné à être examiné pendant la durée de la période non-fébrile de l'année, et même de 1 à 4 mois après l'accès de fièvre bilieuse hémoglobinurique.

A ces 4 classes ci-dessus, qui comprennent les malades de la ville d'Anchialos, j'ajoute aussi deux autres classes comme il suit:

5° Dans cette cinquième classe je range les 17 cas que j'ai observé dans ma clientèle particulière, car j'ai pris le sang destiné à être examiné pendant le cours de l'accès de fièvre bilieuse hémoglobinurique et deux ou trois jours après l'apparition des premières urines noires.

6° Dans cette dernière classe je range les 7 cas que j'ai observé avec Pezopoulos<sup>1)</sup> et qui se répartissent ainsi:

Dans deux cas la prise du sang destiné à être examiné a eu lieu le jour de l'accès.

Dans deux autres cas cette prise de sang a eu lieu chez l'un, le septième jour après l'accès, chez l'autre, le 13<sup>ème</sup> jour.

Dans le cinquième cas la prise de sang a eu lieu le sixième jour après l'accès.

Dans le sixième cas, elle a eu lieu le 15<sup>ème</sup> jour après l'accès.

Enfin dans le septième cas, la prise du sang destiné à être examiné s'est faite quinze jours avant l'accès, durant l'accès, et après l'accès.

Les résultats des examens microscopiques faits par moi, pour ce qui est de la recherche des hématozoaires dans les cas rangés dans les six classes ci-dessus, sont les suivants:

Dans la 1<sup>re</sup> classe, à laquelle il faut aussi rattacher trois cas de la sixième classe, et où le sang destiné à être examiné a été pris de 5 à 10 heures à compter de la première apparition des urines noires, l'examen dans ces 15 cas a été négatif pour ce qui concerne l'existence des parasites paludéens. (Rapport 100 %.)

Dans la 2<sup>me</sup> classe, où le sang destiné à être examiné a été pris 32 heures après l'apparition des urines, qui continuent encore à être noires, l'examen sur deux des 4 cas a été positif par la présence de l'annulaire de *Praecox*. (Rapport 50 %.)

Dans la 3<sup>me</sup> classe se rangent trois cas de la 6<sup>me</sup> classe, chez lesquels le sang destiné à être examiné a été pris, dans le premier cas, le 6<sup>ème</sup> jour après l'apparition des urines noires, dans le 2<sup>ème</sup> cas et dans le 3<sup>ème</sup> cas, le 13<sup>ème</sup> jour. L'examen du 1<sup>er</sup> cas a révélé la présence de quelques schizontes *Vivax*, tandis qu'il a été négatif dans les deux autres. A ces trois cas s'ajoutent aussi dix autres cas encore, chez lesquels le sang destiné à être examiné a été pris 10 à 18 jours après l'accès, et chez lesquels l'examen a montré dans trois cas la présence des schizontes *Vivax*, et dans deux autres, de l'annulaire *Praecox*. (Rapport 46,15 %.)

1) Compt. rend. du 5<sup>ème</sup> Congrès méd. Panhellenique. 1906.

A la 4<sup>ème</sup> classe se rattachent deux cas de la 6<sup>ème</sup> classe, chez lesquels la prise du sang destiné à être microbiologiquement examiné s'est faite le 30<sup>ème</sup> et le 31<sup>ème</sup> jour après l'accès et a démontré, dans le 1<sup>er</sup> cas, une abondance d'annulaires *Praecox* et de gamètes en forme de croissant, et dans le deuxième, de rares annulaires *Vivax*. A ces deux cas il faut aussi ajouter les 30 autres, chez lesquels le sang destiné à subir l'examen microscopique a été pris de 1 à 4 mois après l'accès de fièvre bilieuse hémoglobininurique et a donné les résultats suivants:

Dans 8 cas j'ai retrouvé les schizontes et gamètes *Vivax*; dans 10 cas les annulaires et gamètes *Praecox*; et dans 4 cas des schizontes et des gamètes *Quartes*. C'est-à-dire que sur ces 32 cas il y a un rapport de 75 %.

Dans la 5<sup>ème</sup> classe, où le sang a été pris de 48 à 72 heures après, j'ai constaté, sur les 17 cas observés, 4 cas où les annulaires de *Praecox* étaient présent, 1 cas où existaient les schizontes *Vivax* et un autre où étaient des schizontes et des gamètes *Quartes*. (Rapport 23,52 %.)

La découverte des gamètes dans les cas de la 4<sup>ème</sup> classe permet de supposer que dans le cours de l'accès de fièvre bilieuse hémoglobininurique, ces personnes étaient infectées par les espèces d'hématozoaires découvertes, car, comme l'on sait, on ne rencontre pas chez nous des accès de premières invasions de la deuxième quinzaine de décembre à la fin d'avril.

De ce qui précède nous déduisons les faits suivants:

1<sup>o</sup> Dans les premières heures jusqu'à la 10<sup>ème</sup>, à compter de l'apparition des urines noires, la recherche des hématozoaires paludéens est à peu près toujours négative (100 %).

2<sup>o</sup> Alors que l'accès dure encore, la recherche des hématozoaires dans les jours suivants et surtout de deuxième au sixième jour rend plus certain le rapport flottant de 23 à 50 %.

3<sup>o</sup> Du 6<sup>ème</sup> au 18<sup>ème</sup> jour la recherche des hématozoaires donne un rapport constant de 46,15 %.

4<sup>o</sup> Le rapport des hématozoaires retrouvés par espèce dans les cas ci-dessus s'exprime ainsi:

<i>Praecox</i>	19	soit	50	%
<i>Vivax</i>	15	"	38,46	"
<i>Quarte</i>	5	"	13,15	"

## B.

Nous avons histologiquement examiné le sang dans 36 cas seulement de fièvre bilieuse hémoglobininurique de forme grave, le sang ayant été pris de 5 à 72 heures après la première apparition des urines noires et durant l'accès hémoglobininurique. A ces 36 cas se rattachent aussi 2 cas de fièvre bilieuse hémoglobininurique à forme grave survenus dans le cours de la fièvre typhoïde; dans l'un le 16<sup>ème</sup> jour de la maladie, dans le second, le 21<sup>ème</sup> jour.

Sur ces 36 cas, dans 8 cas (c'est-à-dire un rapport de 22,22 %), la coloration du sang extrait pour être examiné microscopiquement était d'un rouge pâle, tendant plutôt à s'affaiblir, et sa consistance aqueuse, visqueuse, puisque ce sang s'étendait difficilement sur la lame, et même de telle façon que, sur quelques parties de la lame seulement, les globules rouges étaient rangés en un seul tas, quoique les lames fussent très propres.

Dans l'un seulement des 36 cas observés (soit un rapport de 2,77 %), j'ai constaté que le sérum du sang était pâle, indiquant une cholémie, aussi dans un seul cas sur les 36 étudiés j'ai remarqué que le sérum du sang était rougeâtre, ce qui, était un indice d'hémoglobinémie.

Dans tous les autres cas le sérum du sang était presque pâle.

Sur les 36 cas, il y en avait 6 (soit un rapport de 16,66 %) chez lesquels la coagulation du sang était imparfaite. Pendant un certain nombre de minutes le sang extrait et déposé sur les lames, par gouttes, conservait sa fluidité.

Dans la plupart des cas les globules rouges étaient réguliers, et je n'y ai vu aucune altération, sauf dans 4 cas seulement (11,11 %) chez lesquels j'ai observé beaucoup de globules dentelés.

Sur les 36 cas, j'ai observé 10 cas (soit un rapport de 27,77 %), de microcytose. Les petits globules rouges étaient plus fortement colorés que les autres globules rouges.

Sur les 36 cas, il y en avait 5 (soit un rapport de 13,88 %), où j'ai remarqué de poëilocytose telle que celle que l'on rencontre dans les anémies graves.

Sur ces 36 cas il y en avait aussi 15 (soit un rapport de 41,66 %), chez lesquels j'ai pris le sang destiné à être examiné de 5 à 10 heures après le début de l'accès et à une température de 39° à 40°2, et où j'ai observé une grande augmentation du nombre des globules blancs polynucléaires dans un rapport flottant entre 71 à 90 %, contrairement à tout ce que nous avons déjà constaté dans le paludisme.

Sur les 36 cas il y en avait 4 (soit un rapport de 11,11 %) chez lesquels j'avais pris le sang destiné à être examiné de 24 à 32 heures à compter du commencement de l'accès qui persistait décroissant à une température de 38°, j'ai constaté pareillement une augmentation de nombre des globules blancs polynucléaires dans un rapport flottant de 65 à 71 % contrairement à ce qui a été observé dans le paludisme.

Sur les 36 cas observés j'ai constaté que, dans 15 cas (soit un rapport de 41,66 %), chez lesquels j'avais pris le sang dans un état d'apyrexie, et après que l'accès était passé, que les globules blancs mononucléaires s'augmentaient dans un rapport de 55 à 60 %.

Sur les 36 cas j'ai trouvé aussi dans 5 cas (soit un rapport de 13,88 %), des globules blancs mélanifères.

Sur ces 36 cas il y en avait 8 (soit un rapport de 22,22 %) où j'ai retrouvé quelques rares myélocytes.

Sur 5 cas parmi les 36 cas étudiés (soit un rapport de 13,88 %) j'ai retrouvé quelques rares hémato blasts.

Sur 6 cas observés des 36 cas (soit un rapport de 16,66 %), j'ai retrouvé des globules blancs mononucléaires du type Türksche Reizungsformen, de moyenne et grande dimension.

Sur les 36 cas, il y en avait 28 (soit un rapport de 77,77 %), où les cellules éosinophiles s'étaient accrues de 2 à 5 %.

### C.

Ayant, dans 6 cas, mélangé, au sérum provenant du sang pris chez le malade, le sang d'un homme sain, par parties égales ainsi que deux

parties de sérum pour une partie de sang provenant d'un homme sain je n'ai pas constaté d'hémolyse.

\* \* \*

Pour ce qui est des deux cas de fièvre bilieuse hémoglobínurique survenus au cours d'une fièvre typhoïde, j'ai constaté les faits suivants :

Le sérum du sang était physiologique, sauf que lorsque sa consistance était visqueuse, la coagulation du sang se faisait régulièrement.

Le sang destiné à être examiné, qui avait été recueilli alors que la température du malade était de 41° au moment de l'accès de fièvre bilieuse hémoglobínurique, a donné la formule hématologique que voici :

1<sup>er</sup> cas, où le malade âgé d'une trentaine d'années, fut attaqué d'un accès de fièvre bilieuse hémoglobínurique, le 16<sup>ème</sup> jour de la fièvre typhoïde en cours dont il mourut.

Globules mononucléaires	26	%
Globules polynucléaires	70	"
Cellules éosinophiles	4	"
Myélocytes	0,50	"

2<sup>me</sup> cas, où le malade, âgé de 28 ans, fut attaqué d'un accès de fièvre bilieuse hémoglobínurique, le 21<sup>ème</sup> jour de la fièvre typhoïde en cours dont il mourut :

Globules mononucléaires	20	%
Globules polynucléaires	75	"
Cellules éosinophiles	5	"
Myélocytes	0	"

*Nachdruck verboten.*

## Observations hématologiques sur 87 cas de mégalosplénie paludéenne.

Par le Dr. **Jean P. Cardamatis,**

Professeur agrégé des maladies des pays chauds à l'Université d'Athènes.

Avec 2 Fig.

Sur les 87 sujets atteints de mégalosplénie dont j'ai examiné le sang au microscope, j'ai constaté l'existence d'hématozoaires du paludisme dans le sang de périphérie de 70 individus, et j'ai obtenu les résultats suivants :

### Infection simple.

Espèces des plasmodes	Vivax	6 cas	
" " "	Praecox	12 "	
" " "	Quart	30 "	= 48

### Infection mixte de deux plasmodes.

Espèces des plasmodes	Vivax et Praecox	6 cas	
" " "	Vivax et Quart	6 "	
" " "	Praecox et Quart	6 "	= 18

### Infection mixte de trois plasmodes.

Vivax, Praecox et Quart	4 cas	= 4
		70

Pour plus de brièveté nous passons plusieurs tableaux analytiques; on trouvera les observations les plus intéressantes dans les conclusions générales.

Age	Globules blancs				Globules rouges			Hémato- blastes	
Année	Mononucléaires	Polynucléaires	Éosinophiles	Mélanifères	Myélocytes	Observations	Observations		Hématies rouges nucléées
	%	%	%	%					
Mégalosplénies avec plasmodes Praecox et Vivax.									
7	79	19	2	5	0	Quelq. mononucl. form. interméd. neutrophiles. Quelq. basophiles avec granulations oxyphiles.	Quelq. géants. Quelq. polychromatophil. Quelq. dégénérés.	0	Normales.
8	80	18	2	3	0	idem.	idem.	0	idem.
4	70	28	2	4	Quelq. basophil. et neutrophiles.	Quelq. mononucl. form. interméd. et grand. mononucléair. neutrophiles. Quelq. forme Türk.	idem.	0	Abondantes.
5	73	24	3	3	idem.	idem.	idem.	0	idem.
Mégalosplénies avec plasmodes Praecox, Vivax et Quart.									
7	66	31	3	2	0	Quelq. mononuc. grands avec protopl. neutrophile. Quelq. éosinophil. dégénérés.	Quelq. géants. Quelq. polychromatophil. et quelq. dégénér.	0	Rares.
8	69	28	3	1	0	idem.	idem.	0	idem.
8	61	34	5	1	Quelq. neutrophil.	Quelq. form. Türk. Quelq. f. intermédiaire, neutroph. et dégénér. Quelq. éosinoph. dég.	idem et granulation Plehn.	Normoblast.	Normales.
8	65	30	5	2	idem.	idem.	idem.	Quelq. nucléées comme on en trouve dans la syphilis congénitale.	idem.
Mégalosplénies avec cachexie grave, de purpura hémorrhagique et de plasmodes Quart (j'ai pris le sang dans l'apyrexie).									
4	68	29	3	2	0	Quelq. f. Türk. Quelq. basophil. avec granul. oxyphile. Quelq. mononucl. grands avec protoplasm. neutroph. Quelq. éosinoph. dégénér.	Microcytose. Quelq. géants. Quelq. polychrom. Quelq. dégénér.	Mégalo-blast.	Très rares.
5	78	19	3	1	0	idem.	idem.	Normobl. 4% Mégalo-bl. 1%	idem.
5	51	44	5	0	0	Quelq. de form. Türk.	Poecilocyto-se. Quelq. dégénér.	Normobl.	Normales.
5½	59	38	3	2	0	idem et encore quelq. mononucl. neutroph.	idem.	idem.	idem.

Age	Globules blancs				Globules rouges			Hémato- blastes	
Années	Mononucléaires	Polynucléaires	Eosinophiles	Mélanifères	Myélocytes	Observations	Observations		Hématies rouges nucléées
	%	%	%	%					

**Mégalosplénies avec cachexie grave, purpura hémorrhagique et des plasmodes Praecox et Quart (j'ai pris le sang dans l'apyrexie).**

7	67	30	3	1	Quelq. rares neutroph. et éosinophil.	Quelq. mononucl. basophil. avec granulation oxyphile.	Microcytos. Quelq. dégénérés. Quelq. polychrom. Granul. Plehn.	0	Rares.
8	69	28	3	1	idem.	idem.	idem.	0	idem.

**Formes hydrémiques.**

**Mégalosplénies avec plasmodes Praecox et Vivax.**

3	55	43	2	1	Quelq. neutrophiles et éosinophil.	Quelq. mononucl. interméd. basophile avec granul. oxyph. Quelq. petites et grandes form. Türk.	Microcyt. et poecilocyt. Nombreux dégénér. Quelq. rares polychromatophil.	0	Rares.
2 1/2	59	39	2	2	idem.	idem.	idem.	Normoblast. et Mégalobl.	idem.

**Mégalosplénies de type Kala-azar avec des plasmodes Praecox et Quart pendant l'apyrexie.**

4	81	15	4	1	0	Quelq. mononucl. interméd. dégénér. Avec quelq. basophil. abondant. granul. oxynoph. Quelq. grand. monon. neutrophil. Quelq. form. Türk petites et grandes.	Quelq. géants. Quelq. polychromatoph. comme dans l'anémie grave. Poecilocyt. Quelques-uns avec granulation basophile.	Normoblastes et Mégaloblastes.	Rares.
28	85	11	4	2	3% neutroph. et quelques-uns comme à leucém. chroniq.	idem.	idem.	idem.	idem.

**Mégalosplénies de type Kala-azar sans hématozoaires pendant l'apyrexie.**

3 1/2	71	24	5	0	Quelq. grands comme à la leucémie lymph. chronique. 1,05 %.	Quelq. mononucl. interméd. et grands avec protoplasm. neutroph. Quelq. form. Türk. Quelq. éosinophil. dégénér.	Quelq. géants. Quelq. polychromatoph. comme dans l'anémie chronique. Quelq. annulaires. Quelq. apportent des granul. basophile comme à l'intoxication par le plomb.	Normoblast.	Rares.
28	63	34	3	0	Myélocyt. neutrophil. 1,50 %.	Quelq. mononucl. grand. avec protopl. neutrophil. Quelq. f. Türk pet. et grand. Quelq. mononucl. et polynucl. dégénér.	Quelq. géants. Microcytose. Poecilocytose. Très rares avec granul. basophile.	Normobl. et Mégaloblast.	Très rares.
12	80	14	6	0	idem. 0,60 %.	Quelq. basophil. avec granul. oxyph. Quelq. f. Türk pet. et grand. Plusieurs dégénér.	Quelq. géants. Quelq. gris. comme dans l'anémie grave. Poecilocytose.	Normoblast.	idem.





Fig. 1.

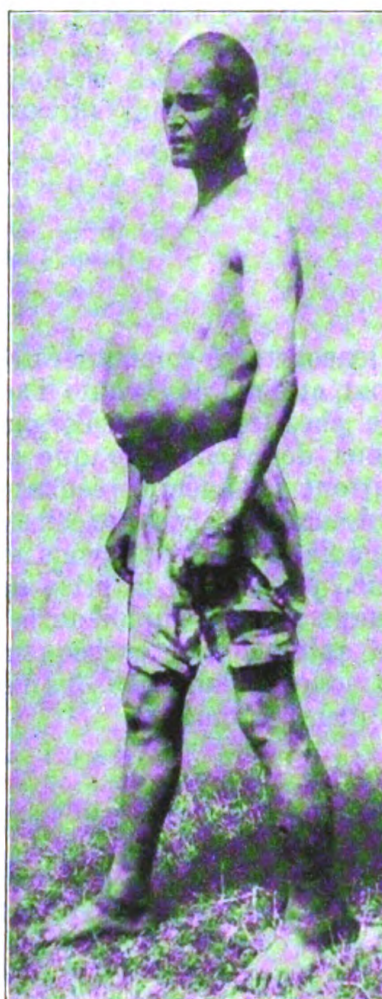


Fig. 2.

Fig. 1. Cachexie paludéenne avec Mégalosplénie de type Kala-azar avec des plasmodes et sans Leishmania.

Fig. 2. Cachexie paludéenne avec Mégalosplénie de type Kala-azar laquelle lors de l'examen n'avait ni hématozoaires ni Leishmania.

### Conclusions générales.

#### A.

Des observations ci-dessus, que nous avons faites sur 87 cas de mégalosplénies provenant de cachexie paludéenne en prenant le sang soit pendant l'apyrexie soit pendant les accès de fièvre dus à une des trois espèces connues d'hématozoaires du paludisme ou à deux ou trois de ces espèces ou même à aucune, il ressort que les hématies blanches mononucléaires sont constamment plus nombreuses que les autres non seulement indépendamment du stade des accès de fièvre en cas de rechûtes, mais encore de la forme de la cachexie paludéenne ainsi que de son intensité. Par conséquent dans les mégalosplénies paludéennes on rencontre constamment une augmentation du nombre des hématies blanches mononucléaires dépassant quelquesfois la proportion de 80 %.

Cette leucocytose mononucléaire est due pour la plupart du temps

non pas aux petites lymphocytes, mais aux hématies blanches mononucléaires moyennes, parce que j'ai observé dans 74 cas sur 87, soit une proportion de 85,05 %, les mononucléaires moyennes augmentées de nombre dans les proportions suivantes:

De 44 %	à 54 %	dans 22 cas
" 55 %	" 64 %	" 22 "
" 65 %	" 74 %	" 19 "
" 75 %	" 84 %	" 7 "
" jusqu'à 94 %	"	" 2 "
" 95 %	"	" 2 "
		<hr/> 74 cas

Cette leucocytose mononucléaire se rencontre non seulement chez ceux qui sont atteints de rechûte d'accès de fièvre par suite de réinfection, mais encore chez ceux dont l'organisme ne porte pas d'hématozoaires. Nous pouvons donc conclure que cette hyperleucocytose mononucléaire est due surtout à l'anémie résultant de l'infection paludique chronique ou à la présence des hématozoaires et des accès fébriles provenant de leur schizogonie et nous pouvons encore conclure qu'elle n'est pas due à la quinine, parce que la prise du sang a eu lieu, dans certains cas, bien longtemps après l'emploi de la quinine et dans d'autres avant tout usage de la quinine. Par conséquent, après ce qui vient d'être dit, cette leucocytose mononucléaire dans les mégalo-splénies paludéennes ne signifiait qu'un haut degré d'anémie.

\* \* \*

Dans 43 cas sur 87, soit une proportion de 49,42 %, j'ai trouvé une augmentation de nombre des cellules éosinophiles dans les rapports suivants:

De 3 %	dans 23 cas
" 4 %	6 "
" 5 %	7 "
" 6 %	1 "
" 7 %	2 "
" 9 %	2 "
" 14 %	2 "
	<hr/> 43 cas

Cette éosinophilie dans 7 cas, où elle se trouvait dans la proportion de 6 à 14 % avec les conclusions ci-dessous fait supposer dans ces 43 cas une anémie intense et prouve que dans d'autres cas de mégalo-splénie paludique elle peut être accompagnée de leucocytose.

\* \* \*

Dans la plupart des cas les polynucléaires neutrophiles sont grandement diminués en nombre et je ne les ai rencontrés multipliés dans la proportion de 55 % que chez deux nourrissons qui tous deux étaient en même temps atteints de staphylococcie. Ils étaient encore multipliés dans la proportions de 55 % chez deux enfants de 7 ans, parce qu'ils portaient tous deux des abcès.

\* \* \*

Dans 50 cas sur 70, soit une proportion de 71,32 %, j'ai trouvé des hématies blanches mononucléaires mélanifères dans les proportions suivantes:

Dans	1 cas	0,65 %
"	17 "	1 %
"	1 "	1,34 %
"	19 "	2 %
"	7 "	3 %
"	1 "	4 %
"	2 "	5 %
"	1 "	6 %
"	1 "	10 %
	<u>50 cas</u>	

D'après mes recherches ces mélanifères étaient :

Dans	10 cas	des mononucléaires	moyens
"	16 "	"	grands
"	24 "	"	grands et moyens
	<u>50 cas</u>		

\* \* \*

Dans 40 cas sur 87, soit une proportion de 45,98 %, j'ai trouvé les hématies blanches mononucléaires du type Türksche Reizungsform.

\* \* \*

Dans 49 cas sur 87, soit une proportion de 56,32 %, j'ai remarqué quelques hématies blanches mononucléaires moyennes et de grandes avec un protoplasme neutrophile homogène et quelquefois avec de très petites granulations neutrophiles.

\* \* \*

Dans 27 cas sur 87, soit une proportion de 31,3 %, j'ai observé que quelques-unes des hématies blanches mononucléaires moyennes et grandes étaient dégénérées. Étaient dégénérées dans 19 cas, celles qui avaient un protoplasme neutrophile.

\* \* \*

Dans 13 cas sur 87, soit une proportion de 14,94 %, j'ai remarqué que des moyennes et des grandes hématies blanches mononucléaires à protoplasme basophile homogène, les unes étaient en dégénérescence initiale et les autres en pleine dégénérescence.

\* \* \*

Dans 24 cas sur 87, soit une proportion de 27,58 %, j'ai trouvé quelques éosinophiles dégénérés.

\* \* \*

Dans 37 cas sur 87, soit une proportion de 43,67 %, j'ai trouvé les myélocytes suivants :

Dans	18 cas,	soit une proport. de 20,68 %,	des myélocytes neutrophiles
"	2 "	" " " " " " 2,29 %,	" " " " " " éosinophiles comme dans la
"	13 "	" " " " " " 14,94 %,	" " " " " " leucémie myélogène
"	2 "	" " " " " " 2,29 %,	" " " " " " quelques myélocytes comme dans la leucémie
"	2 "	" " " " " " 2,29 %,	" " " " " " lymphatique chronique
"	2 "	" " " " " " 2,29 %,	" " " " " " des myélocytes neutrophiles et éosinophiles
"	2 "	" " " " " " 2,29 %,	" " " " " " et basophiles
	<u>37 cas</u>		

La découverte des myélocytes à la proportion de 43,67 %, comme dans les cas ci-dessus et, plus particulièrement, la présence des myélocytes, ainsi que de ceux qui ont été observés dans la leucémie lymphatique chronique et la présence des myélocytes éosinophiles, comme ceux que l'on rencontre dans la leucémie myélogène, prouvent clairement une certaine irritation de la moelle des os, c'est-à-dire une réaction provenant de celle-ci. Par conséquent dans les mégalo-splénies chroniques provenant de cachexie paludique et principalement dans les cachexies aqueuses avec mégalo-splénie, il semble que la moelle des os est atteinte plus ou moins de troubles secondaires. Mais la question de savoir si le paludisme peut être une cause de mégalo-splénie leucémique constitue l'objet d'une nouvelle étude à faire.

## B.

Dans 22 cas sur 87, soit une proportion de 25,28 %, j'ai observé une microcytose, comme dans l'anémie maligne.  
 " 19 " " 87, " " " " 21,83 %, j'ai observé une poecilocyt., comme dans l'anémie chronique intense.  
 " 49 " " 87, " " " " 56,32 %, j'ai observé des géants.  
 " 34 " " 87, " " " " 39,08 %, " " " polychromatophil.

Dans les 34 cas de polychromatophiles, les hématies rouges présentaient les particularités suivantes:

Dans 8 cas quelques-unes étaient d'une rouge intense.  
 " 6 " " portaient une granulation basophile comme dans l'intoxication par le plomb.  
 " 2 " " portaient une légère granulation neutrophile.  
 " 3 " " étaient grisâtres comme dans l'anémie maligne.

\* \* \*

Dans 8 cas sur 22 d'infection par le *Vivax*, soit une proportion de 36,36 %, quelques-unes des hématies rouges portaient une granulation rouge <sup>1)</sup>.

Dans 9 cas sur 87, soit une proportion de 10,34 % j'ai trouvé la granulation de Plehn.  
 " 5 " " 47, " " " " 11,36 % j'ai remarqué une abondante granulation sur quelques hématies rouges de celles qui possédaient des plasmodes de la quarte <sup>2)</sup>, de même que la granulation de Maurer observée dans quelques hématies rouges contenues dans les plasmodes du *Praecox*.

\* \* \*

Dans 23 cas sur 87, soit une proportion de 26,43 %, j'ai observé des hématies rouges nucléées comme suit:

Dans 9 cas sur 87, soit une proportion de 10,34 %, quelques normoblastes.  
 " 5 " " 87, " " " " 5,74 %, des "mégalo-blastes" et des normoblast.  
 " 6 " " 87, " " " " 6,89 %, de rares mégalo-blastes, comme dans l'anémie maligne.  
 " 1 " " 87, " " " " 1,14 %, de rares mégalo-blastes, comme dans l'anémie maligne.  
 " 2 " " 87, " " " " 2,29 %, des normoblastes, dont quelques rares  
 23 cas étaient en caryolyse avec déformations variées du noyau, comme on en rencontre dans l'anémie intense et la syphilis infantile héréditaire.

\* \* \*

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 42. 1906.

2) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 40. 1906.

Quant aux hémato blastes, j'ai remarqué que:

Ils étaient abondants dans	5 cas sur 87, soit une proportion de	5,68 %
„ „ relativ. abondants dans	21 „ „ 87, „ „ „	23,86 %
„ „ rares dans	42 „ „ 87, „ „ „	47,72 %
„ „ très rares dans	19 „ „ 87, „ „ „	22,72 %
	87 cas	

\* \* \*

Pour la coloration des préparations, nous avons employé notre propre méthode <sup>1)</sup> ainsi que la liqueur de Giemsa.

*Nachdruck verboten.*

## Beitrag zur Lösung der Frage, ob Schistosomum Mansoni identisch ist mit Schistosomum haematobium.

[Aus dem Militärlazarett zu Paramaribo (Surinam),  
(Direktor Dr. E. A. Koch, Oberstabsarzt).]

Von P. C. Flu, Stabsarzt der niederl. ostind. Armee.

Mit 6 Figuren.

In Brauns Handbuch „Die tierischen Parasiten des Menschen“ findet man unter der Trematodenfamilie der Schistosomidae (Looss) 2 Arten angeführt, die als Parasiten bei dem Menschen auftreten können, und zwar Schistosomum haematobium und Schistosomum japonicum.

Sch. haematobium ist der Erreger der hauptsächlich in Aegypten endemisch vorkommenden Bilharzia-Krankheit; Sch. japonicum (Katsurada) dagegen ist die Ursache einer Krankheit (Katayama-Krankheit), die bis jetzt nur in Japan, China und auf den Philippinen bekannt ist.

Zwischen Sch. haematobium und Sch. japonicum bestehen sowohl zwischen den ausgewachsenen Tieren als auch zwischen ihren Eiern so bedeutende morphologische Unterschiede, daß Zweifel an der Artverschiedenheit beider Würmer niemals laut geworden sind. Außerdem gibt jede der Arten Veranlassung zu Krankheiten mit ziemlich verschiedenen Symptomen, und auch ihre geographische Verbreitung ist eine verschiedene.

So haben in der Regel die ausgewachsenen Tiere des Sch. haematobium größere Dimensionen als die des Sch. japonicum (resp. 12—14 mm und 8—12 mm). Während die Körperoberfläche des Männchens bei Sch. haematobium mit Warzen besetzt ist, ist der Körper des Sch. japonicum ganz glatt, auch sind bei Sch. japonicum die Eierstockfollikel dichter gruppiert als bei Sch. haematobium.

Große Unterschiede bestehen zwischen den Eiern. Die des Sch. japonicum sind rund oder oval (ohne Deckel) und ohne Enddorn,

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 42. 1906.

sie messen 0,075—0,09:0,53—0,075 mm; die des *Sch. haematobium* sind spulenförmig, in der Mitte etwas stärker angeschwollen, ohne Deckel und am Hinterende mit einem Dorne versehen.

Nach Untersuchungen Dr. Leipers<sup>1)</sup>, des Helminthologen der London School of Tropical Medicine, scheint es indessen, als ob auch die Eier des *Sch. japonicum* einen Dorn haben. Leiper konnte in den Faeces eines Hundes, der an einer Krankheit laborierte, die mit der Katayamakrankheit identisch ist, und ferner noch in 3 Fällen von Katayamakrankheit bei Menschen Eier des *Sch. japonicum* finden „where there was present a curious little nipple-like knob or spine situated a short distance from one of the poles of each egg“.

Bei *Sch. japonicum* hat man Erscheinungen an Leber und Därmen, und Blasensymptome kommen niemals vor, was bei *Sch. haematobium* beinahe wohl immer der Fall ist.

Beide Wurmarten haben ihre eigene geographische Verbreitung. *Sch. japonicum* findet sich nach Looss in Afrika (besonders in Aegypten), Syrien, Mesopotamien, auf Madagaskar, Mauritius, Réunion und auch noch in Nord-Amerika, West-Indien, Vorder-Indien usw. *Sch. japonicum* ist vorläufig nur in Japan, China und auf den Philippinen gefunden worden.

Es ist schon sehr lange bekannt, daß man bei der Untersuchung der Fäkalien Bilharzia-Kranker neben den Eiern mit endständigem Dorn auch solche findet, bei denen der Dorn nicht endständig, sondern deutlich seitlich ist, während der seitliche Dorn auch viel größer ist als der endständige. Ueber die Bedeutung dieses Dornes ist und wird noch bis heute gestritten. Looss<sup>2)</sup> und mit ihm die meisten deutschen Autoren betrachten beide Eierformen als zu ein und derselben Sorte gehörig. Nach Looss sind die Eier mit seitlichem Dorn Mißbildungen, unbefruchtete Eier, die sehr inkonstant im Beginne der Geschlechtsfunktionen gebildet werden. Er führt an, daß schon Bilharz und Montey die Eier mit seitlichem Dorne stets vereinzelt in isolierten Weibchen fanden, und spricht die Möglichkeit aus, daß geschlechtsreife, noch nicht kopulierte Weibchen nur Eier mit seitlichem Dorn hervorbringen können.

Je länger, je mehr aber hat die systematische Untersuchung von Fäkalien und Urin und das Studium von Symptomen der an den verschiedenen Formen der Bilharzia-Krankheit Erkrankten Tatsachen geliefert, die geeignet sind, Looss Ansicht umzustoßen.

Zuerst wurde von Sonsino in Aegypten und später mit Bestimmtheit von Patrick Manson die Vermutung ausgesprochen, daß die Eier mit seitlichem Dorn einer anderen Wurmspecies angehören, als die mit endständigem Dorn. Der neuen Species gab man den Namen *Sch. Mansoni*.

Sambon ist 1907 gelegentlich eines Vortrages in „The Society of Tropical Medicine and Hygiene“ energisch eingetreten für die Verteilung der Bilharzia-Erreger in *Sch. haematobium* und *Sch. Mansoni*.

Nach ihm verleihen die folgenden Tatsachen der Species *Sch. Mansoni* Existenzberechtigung:

1) Leiper, R. T., Note on the presence of a lateral spine in the eggs of *Schistosomum japonicum*. (Journ. Tropic. Med. Vol. 14. p. 75—77.)

2) Looss, A., Von Würmern und Arthropoden hervorgerufene Erkrankungen. (Mense, Tropenkrankh. Bd. 1. p. 102.)



1) *Sch. Mansoni* hat anders gebildete Eier als *Sch. haematobium*. Er gibt<sup>1)</sup> für die 3 *Schistosomum* - Eierformen die folgenden Maße an:

<i>Sch. japonicum</i> rund oder oval	75—90 $\mu$ lang (ohne Dorn)
<i>Sch. haematobium</i> elliptisch	110—129 „ „ (Dorn endständig)
<i>Sch. Mansoni</i> „	112—162 „ „ (Dorn seitlich)

2) *Sch. Mansoni* hat einen anderen Wohnplatz, als *Sch. haematobium*. Die erstere greift niemals die Blase an, die zweite immer.

3) *Sch. Mansoni* hat eine ganz andere geographische Verbreitung, als *Sch. haematobium*. Die erste ist die einzige Sorte, die in Westindien und Südamerika gefunden wird<sup>2)</sup>. Auch in bestimmten Gegenden Afrikas hat man mit *Bilharzia* infizierte Striche angetroffen, wo in den Fäkalien ausschließlich Eier mit seitlichem Dorn gefunden wurden.

Von Looss wurde in den *Annals of Tropic. Med. a. Parasitol.*, 1. Juli 1908 eine scharfe Kritik des Vortrags Sambons ausgeübt, die sehr persönlich ist. Er selbst bringt nichts Positives, um Sambons Ansicht zu widerlegen. Er bemerkt unter anderem, daß es, um eine neue Species zu bilden, nötig ist, Merkmale zu beschreiben, die immer anwesend und leicht zu finden sein müssen, gibt aber gleichzeitig zu, es könne sehr leicht möglich sein, daß 2 Würmer, die einander morphologisch sehr ähnlich sind und bei denen nur die Eier einen Formunterschied zeigen, zu verschiedenen Sorten gehören könnten; in der Zoologie hat man hiervon Beispiele genug.

Sambon meint, daß bei den Weibchen Unterschiede in der Form des Ootyps bestehen. Schon 1888 berichtete Prof. Fritsch, daß bei Weibchen des *Schistosomum*, die in ihrem Uterus Eier mit seitlichem Dorn hatten, die Oeffnung der Schalendrösen nicht in der Mitte, sondern seitlich in den Ootyp mündete. Ferner meint Sambon noch, bei den Männchen Unterschiede in Form, Größe und Lage der Hautknoten wahrzunehmen. Looss findet das alles sehr unzureichend (Sambon untersuchte nur schlecht konservierte Exemplare). Allein dann würde Sambons Theorie eine große Stütze finden, wenn es gelänge, Weibchen zu finden, die in dem *Canalis gynaecophorus* von Männchen eingeschlossen in den Venen des Rectums oder des Dickdarmes vorkämen und, wenn man dann in dem Uterus dieser Tiere ausschließlich Eier mit seitlichem Dorn fände. Merkwürdig genug erbringt Looss diesen Beweis selbst. Er erwähnt nämlich, daß es ihm gelungen sei, Eier mit seitlich gestelltem Dorn zu finden in dem Uterus von Weibchen, die in dem *Canalis gynaecophorus* von Männchen sich befanden und  $\pm 7$  cm von dem Anus entfernt in einer der *Venae haemorrhoidales* gefunden wurden. Doch führt Looss in demselben Werke eine Reihe von Theorien und Hypothesen an, um zu erklären, warum die Eier mit seitlichem Dorn stets in den Fäkalien und niemals im Urin gefunden werden.

Beim Studium der Literatur zeigt es sich, daß alle Autoren, die ihre Untersuchungen in Amerika verrichteten, darüber miteinander einverstanden sind, daß man stets Eier mit seitlichem Dorn und ausschließlich diese findet. Niemals traf einer dieser Untersucher die Eier

1) Sambon, Louis, *Remarks on Schistosomum Mansoni*. (*Journ. Tropic. Med.* 16. Sept. 1907.)

2) Sambon, Louis, *What is Schistosomum Mansoni?* (*Journ. Tropic. Med.* Vol. 12. p. 1—12.)

im Urin, sondern immer in den Fäkalien an, bei keinem ihrer Patienten kam es jemals zu Blasenstörungen. Froés João<sup>1)</sup> fand in Bahia stets Eier mit seitlichem Dorn, die nach ihm zu *Sch. Mansoni* gehören. Dasselbe ist mit Da Silva<sup>2)</sup> der Fall, der seine Untersuchung ebenfalls in Bahia vornahm. Mathis und Baujean untersuchten in Tonkin einen aus Guadeloupe eingeschleppten Fall, und fanden ausschließlich Eier mit seitlichem Dorn<sup>3)</sup>.

Turner<sup>4)</sup>, der in Südafrika eine ausgebreitete Untersuchung nach der Bilharziakrankheit durchführte, möchte zwei verschiedene Species annehmen. Auch er fand Unterschiede in der geographischen Verbreitung (und zwar in ein und demselben Lande) und ferner die Eier mit lateralem Dorn stets in den Fäkalien und niemals im Urin, solche mit terminalem Dorn in Urin und Fäkalien. Ihm zufolge ist es sehr schwierig, sich vorzustellen, wie es möglich ist, daß dieselbe Wurmart in einer bestimmten Gegend beide Eisorten und in anderen nur die eine würde produzieren können. Auch kommt nach ihm Cirrhosis der Leber ausschließlich in den Gegenden vor, wo man die Eier mit seitlichem Dorn findet. Turner ist jedoch in seiner Äußerung sehr vorsichtig, da er einmal in einem Lungengefäß einzelne Exemplare von *Schistosomum* fand, wovon 3 Weibchen, die, im *Canalis gynaecophorus* von Männchen eingeschlossen, im Uterus Eier mit lateral gestelltem Dorn hatten. Er erwartete, daß das Lungengewebe mit Eiern des *Sch. Mansoni* infiltriert sein würde, fand aber allein Eier mit terminalem Dorn. Turner scheint anzunehmen, daß diese Eier von den Weibchen produziert waren, die er in den Lungengefäßen fand, was indessen noch lange nicht bewiesen und sogar sehr unwahrscheinlich ist. Es ist nämlich doch bekannt, und meine Untersuchungen haben mich noch einmal davon überzeugt, daß *Sch. Mansoni* allein in den Darmvenen und weiteren Verzweigungen der Vena porta lebt, während *Sch. haematobium* die Verzweigungen der Blasenvenen zum Aufenthaltsorte wählt. Nun wird schon aus anatomischen Gründen für die Eier des *Sch. haematobium*, die sich in den Blasenvenen befinden, die Gelegenheit, um embolisch mitgeschleppt in verschiedenen Organen und vor allen Dingen in der Lunge gefangen zu werden, unendlich viel größer sein, als für diejenigen des *Sch. Mansoni*, die immer von der Leber gefangen werden. Die Möglichkeit also, daß sowohl die von Turner gefundenen Weibchen, die in ihrem Uterus Eier mit lateralem Dorn hatten, als auch die Eier mit terminalem Dorn, die er in der Lunge antraf, als Embolien respektive von den Venae haemorrhoidales und von den Blasenvenen nach der Lunge befördert sind, und es läßt sich erklären, warum Turner im Lungengewebe Eier mit endständigem Dorn fand, obwohl in den Lungengefäßen (als große Seltenheit) drei befruchtete Weibchen von *Sch. Mansoni* gefunden wurden.

1) Froés João, A. G., *Schistosomose rectal na Bahia*. (Brazil Medico. 1908. No. 38.)

2) Da Silva, Pira ja, Contribution on the study of *Schistosomum* in Bahia. (Brazil. Journ. of Tropic. Med. 1. Juni 1909.)

3) Mathis, C., et Baujean, Un cas de Bilharziose intestinale contractée à la Guadeloupe et observée au Tonkin. (Extr. du Bull. Soc. méd. chirurg. de l'Indochine. Mars 1910.)

4) Turner, G. A., An account of some of the helminthes occurring among the South African Natives. (Journ. Tropic. Med. Vol. 13. p. 33—40 u. Vol. 13. p. 50—59.)

Andere Forscher sehen beide Eiformen entweder als zu einer Art gehörig an, oder berühren diese Frage überhaupt nicht.

So scheint Braun<sup>1)</sup> das Vorkommen der Eier mit lateralem Dorn in den Fäkalien überhaupt nicht anzunehmen, denn er schreibt, daß Eier der Bilharzia, die in dem Körper des Wirtes bleiben, keinen terminalen, sondern einen seitlich gestellten Dorn haben.

Scheube<sup>2)</sup> sagt von den Eiern der Bilharzia, daß sie oval und von gelber Farbe sind und einen Dorn besitzen, der sich meistens am hintersten, breiten Eipol, selten an der Seite befindet. Nach ihm findet man im Urin und in der Blasenwand stets Eier mit terminal gestelltem Dorn, in den Fäkalien sowohl Eier mit terminal als mit lateral gestelltem Dorn.

Auch Looss fand im Urin und in der Blasenwand niemals andere als Eier mit polar gestelltem Dorn. Allein Pfister berichtet (gelegentlich eines Referates „Arch. f. Schiffs- u. Tropenkrankh.“ Bd. 15. Heft 15. p. 170), daß er auch im Urin Eier mit seitlichem neben solchen mit endständigem Dorne gefunden hat.

Gegenwärtig ist also das Problem der Unität oder Dualität der Bilharzia-Erreger in ein Stadium gekommen, worin sehr viel für die Dualität der Erreger spricht, wofür indessen der strenge Beweis noch nicht erbracht ist.

In Ländern, in denen man beide Eiformen findet, wird die Lösung dieser Frage viele Schwierigkeiten bieten. Mehr Aussicht auf Erfolg haben Forscher, die ihre Nachforschungen in Ländern anstellen, wo nur eine der Eiformen gefunden wird. Ein solches Land ist Surinam, wo allein Eier mit lateralem Dorn gefunden wurden.

In dem Militärlazarett zu Paramaribo werden die Fäkalien beinahe aller Patienten auf Parasiteneier untersucht. Dank dieser systematischen Untersuchung gelang es mir, 15 Fälle von Schistosomosis geraume Zeit lang (4 Wochen bis 7 Monate) eingehend zu beobachten. Auch ich fand Eier allein in den Fäkalien und niemals im Zentrifugat des Urins.

Die Eier hatten alle einen seitlich gestellten Dorn und, obwohl ich bis jetzt 1000 Eier untersucht und besonders danach gesucht habe, gelang es mir nicht, auch nur 1 Ei mit terminal gestelltem Dorn zu finden, obgleich bei einigen der untersuchten Fälle die Zahl der Eier in den Fäkalien ziemlich groß war (2—3 Eier in jedem Gesichtsfelde bei 80-facher Vergrößerung).

Bei oberflächlicher Untersuchung, besonders wenn man die Fäkalien in einer etwas großen Menge physiologischen Salzes verteilt hat, konnte es scheinen, als ob einige Eier mit einem kleinen, terminal gestellten Dorne versehen waren. Ein sehr schwacher Druck, z. B. mit einer Platinaschlinge auf das Deckglas ausgeübt, verursacht Drehung des Eies um eine Achse, und wir bemerken, daß der Dorn seitlich gestellt ist und sich nur terminal gestellt präsentiert, weil er dem Auge des Beobachters zugekehrt oder von ihm abgewendet war.

Niemals bekam ich den Eindruck, daß die Eier degeneriert oder unbefruchtet waren. In den Fäkalien wurden gefunden:

1) Braun, Max, Die tierischen Parasiten des Menschen. p. 186—202.

2) Scheube, B., Die Krankheiten der warmen Länder. 4. Aufl. 1910.

1) Eier, in denen eine deutliche Eizelle und auch Dotterzellen zu erkennen waren.

2) Eier mit normal entwickeltem Miracidium.

3) Eier mit einem Inhalte, der aus Hyalinmasse besteht mit sehr vielen Fetttropfen (?). Sehr wenige angetroffen.

4) Eier, die verkalkt waren, eine braunrote oder schwarze Farbe hatten, keine Struktur erkennen ließen und in denen nur noch ein kleiner Rest des seitlich gestellten Dornes zu sehen war.

5) Eierschalen und

6) Eier, die von einer Hyalinmasse umhüllt waren, die das Ei wie eine Kapsel umgab.

In Surinam scheint der Parasitismus des *Sch. Mansoni* nur selten zu klinischen Erscheinungen zu führen, vielleicht weil die Infektionsmöglichkeit nicht sehr groß ist, wodurch wiederholte Infektion sehr selten ist. Auch haben erst meine Forschungen die Aufmerksamkeit auf diese Krankheit gelenkt, so daß es sehr wohl möglich ist, daß sich später herausstellt, daß die Zahl der Patienten größer ist als wir augenblicklich annehmen. Nur zwei der 15 von mir beobachteten Fälle zeigten Symptome, die sich aus dem Parasitismus des *Sch. Mansoni* erklären ließen.

Einer von ihnen klagte über Beschwerden bei der Defäkation und über Schleim und Blut beim Stuhlgang.

Ein anderer Patient hatte ein schweres Leiden. Er konnte monatelang beobachtet werden, und nach seinem Tode war eine Leichenschau möglich, die mir gestattete, die oben auseinandergesetzte Frage über die Dualität der Biharziaerreger großenteils zu lösen. Krankheitsgeschichte und Sektionsbericht folgen hier:

Patient A., Mann von ungefähr 40 Jahren, von Beruf Landbauer, von mittelmäßiger Größe und kräftigem Körperbau, ist seiner Aussage nach schon geraume Zeit krank, aber so wenig intelligent, daß er nicht genau angeben kann, wann und wie die Krankheit begonnen hat. Er ist kein Potator, hat keine Lues und litt früher an Malaria.

Die physische Untersuchung lehrt, daß die Brustorgane normal sind, der Puls ist regelmäßig, gut gefüllt und nicht frequent.

Der Bauch ist durch Ascites geschwollen, die Bauchorgane, Leber und Milz, sind nach oben gedrückt. Die Flüssigkeit in der Bauchhöhle ist beweglich, Druck, um Leber und Milz zu palpieren, verursacht Patient Schmerzen.

Der Stuhlgang ist breiig. Während der Krankheit wechseln Tage mit normalem Stuhlgang mit solchen ab, in denen er breiig und mit wenig Schleim und Blut vermischt war.

Der Urin ist normal, enthält namentlich kein Eiweiß und im Zentrifugat lassen sich keine Eier des *Sch. Mansoni* nachweisen.

Es besteht kein Oedem der unteren Extremitäten.

Da infolge der großen Spannung der Flüssigkeit in der Bauchhöhle die Bauchorgane nicht zu palpieren sind und es dem Patienten übel wird, wird Bauchpunktion vorgenommen, wobei ich eine große Menge, ungefähr 15 Liter, einer hellen, bernsteingelben Flüssigkeit entleert. Nun ist die Leber zu palpieren, und es stellt sich heraus, daß sie verkleinert ist; sie reicht mit ihrem Unterrande, der scharf und hart ist, 4 Finger unter den Processus xyphoideus. Die Leberoberfläche ist höckerig, die Palpation schmerzlich.

Die Milz steckt handbreit unter dem Rippenbogen und ist hart.

Uebereinstimmend mit dem anatomischen Platze des Dickdarmes fühlt man einen dicken, harten, schmerzhaften Strang. Besonders auf dem Platz der Darmflexuren und der Flexura sigmoidea ist dieser Strang sehr dick.

Bei der Untersuchung per rectum ist von einer Striktur nichts zu merken, die Schleimhaut scheint ein wenig rauher zu sein als sonst.

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Fäkalien vermißte man Amöben oder andere Protozoen; was Parasiteneier betrifft, so wurden sehr viele Eier des *Sch. Man-*

soni gefunden. In jedem Gesichtsfelde sah man mindestens eins, manchmal auch wohl drei Eier. Alle Eier hatten einen deutlich und stark entwickelten, lateral gestellten Dorn.

Die Diagnose wurde auf Bilharziose des Darmes und der Leber gestellt. Die Therapie bestand in Verabreichung von Eichhorsts Mittel (Decoct. althaeae 200, Tart. kal. 10, Syr althaeae 30), regelmäßigen Bauchpunktionen und war weiter diätetisch.

Die Kräfte des Patienten gingen trotzdem mit raschen Schritten zurück, und er verschied wenige Monate nach seiner Aufnahme in das Lazarett.

Die Sektion bestätigte die klinische Diagnose.

In der Bauchhöhle fand man eine große Menge einer trüben Flüssigkeit, worin sehr viele Fibrinflocken. Die Därme waren an sehr vielen Stellen aneinander geklebt, das Peritoneum war mit Fibrin bedeckt, injiziert und hatte seinen Glanz vollkommen verloren. Es waren also unverkennbare Zeichen von Peritonitis zu bemerken, wofür man keine Ursache finden konnte, so daß angenommen werden mußte, daß sie nach einer der vielen Bauchpunktionen eingetreten ist.

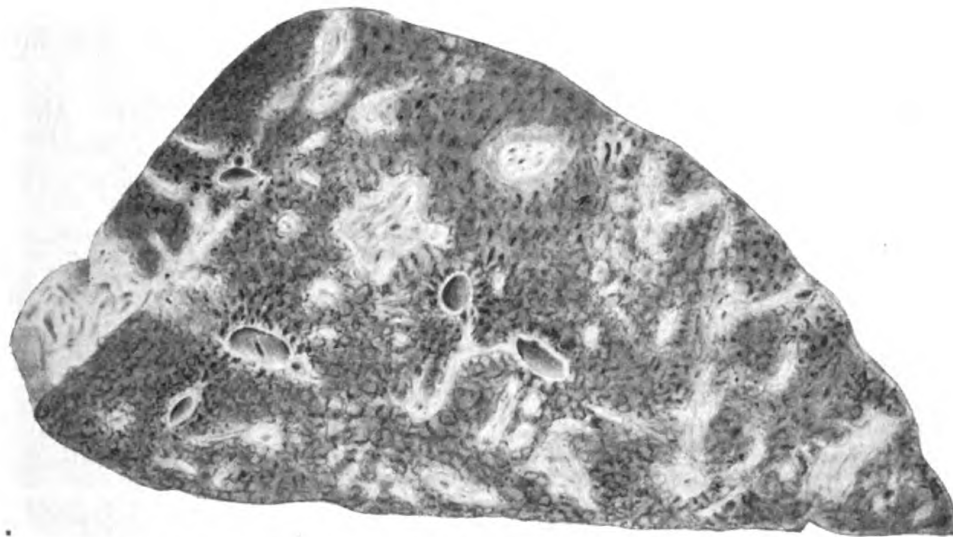


Fig. 1. Bindegewebswucherung in der Leber bei Bilharzia Mansoni. Nat. Größe. Eigene Beobachtung.

Lunge und Herz zeigten keine Abweichungen.

Die Milz war vergrößert, die Kapsel stellenweise verdickt, das Aussehen das einer Stauungsmilz; ihr Gewicht betrug 600 g.

Die Nieren zeigten keine Abweichungen.

Die Leber ist verkleinert. Die Ränder sind scharf, die Oberfläche ist höckerig, die Kapsel am Platze der Einschnürungen verdickt. Die Farbe ist grau, die Konsistenz fest. Das Ganze macht nicht den Eindruck einer Leber bei Laennecscher Cirrhose; größer ist die Uebereinstimmung mit einer Luesleber mit kleinen Beulen, die von sehr verschiedener Größe sind.

Bei Durchschneidung knirscht das Lebergewebe. Die Schnittfläche zeigt typisches Aussehen. Das Lebergewebe hat eine braungraue Farbe, das Bindegewebe ist stark vermehrt. Hauptsächlich um die großen Gefäße ist das Bindegewebe hypertrophisch. Man sieht die Gefäße wie bleistiftdicke und dickere Stränge durch das Lebergewebe hin laufen. Die Gefäßwand ist teils durch Periphlebitis, teils durch Endophlebitis verdickt, bei einigen Gefäßen ist die Wand mehr als 0,5 cm dick und von dem Lumen ist nicht viel mehr als ein sehr enges, manchmal kaum für ein Haar passierbares Kanälchen übrig geblieben. Bei einzelnen Gefäßen ist auch dieses Kanälchen verschwunden und das Gefäß ganz, teilweise auch durch Thrombose, obliteriert. Auch in dem Lebergewebe, das zwischen den veränderten Gefäßen liegt, findet man bei eingehender Beobachtung Bindegewebswucherung, stecknadelkopfgroße und größere Bindegewebsinseln.

Im allgemeinen ist die Leber sehr blutarm.

Die Gallenblase enthält normale Galle und ist übrigens nicht verändert.

Sehr verändert sind auch das Mesocolon und der Dickdarm.

Das Mesocolon und ein großer Teil des Mesenteriums des Ileums sind infolge von Bindegewebswucherung in eine, an manchen Stellen wohl 8 cm dicke, harte, fibröse Masse verwandelt, wodurch das Mesocolon als ein Tumor erscheint. Auf dem Schnitt durch das verdickte Mesocolon findet man mäßig vergrößerte Drüsen.

Am verdickten Mesocolon ist der Darm befestigt, der als ein plattgedrückter Strang erscheint. An einzelnen Stellen, hauptsächlich um die Flexuren, ist der Darm so in die Klemme geraten, daß sein Lumen kaum für den Zeigefinger passierbar ist.

Die Darmwand ist ungeheuer verdickt. Die Schleimhaut ist hyperämisch, hypertrophisch und mit vielen Ekchymosen und dickem, zähem, etwas blutig gefärbtem Schleim bedeckt. Dicht bei der Flexura sigmoidea, auch in dem Colon transversum und in der Nähe des Coecums findet man eine papillare Wucherung der Mucosa (état mamelonné).

Die Blase ist normal.

### Mikroskopische Untersuchung der Organe.

Leber. Die acinöse Zeichnung ist beinahe ganz verschwunden, und nur in einzelnen Feldern findet man sie angedeutet. Die Gefäßwände, auch die der kleineren, die makroskopisch noch eben sichtbar waren, sind verdickt und das Bindegewebe ist im allgemeinen erheblich vermehrt. Doch weicht das Bild ganz und gar von dem ab, was man in den Hand- und Lehrbüchern über die Erscheinungen bei den verschiedenen Formen der Lebercirrhose angegeben findet. Sehr ungleichmäßig verbreitet, bald da, wo vermutlich zwei Leberacini aneinander grenzen müßten, bald dicht bei der Vena centralis gelegen, findet man rund oder ovale Bindegewebsmassen von 0,5—1 mm Diameter. Diese Massen stehen isoliert, verbinden sich nur ausnahmsweise miteinander, und hierdurch entsteht also nicht das Bild, wie wir es bei der Laennec'schen Cirrhose finden. Nach dem Studium einer sehr großen Anzahl von Präparaten der verschiedensten Teile der Leber wird es möglich, sich von der Genesis dieser Bindegewebsinseln eine Vorstellung zu bilden.

Mehrere der von den Weibchen in die Vena porta gelegten Eier werden von dem Blutstrom der Leber zugeführt und in diesem Organe von den Kapillaren, die sich verstopfen, gefangen. Das Lebergewebe reagiert auf diese Eierembolien mit einer kleinzelligen Infiltration in der Umgebung des wie ein Corpus alienum wirkenden Eies. Auch scheint es, daß beim Zugrundegehen des Eies Stoffe frei werden, die einen nekrotisierenden Einfluß auf die Leberzellen haben. Man sieht wenigstens in der Umgebung des Eies viele nekrotisch zugrunde gegangene Leberzellen.

Im Zentrum sehr junger, kleinzelliger Infiltrate sieht man, umgeben von nekrotischen Leberzellen, noch das unveränderte Ei oder später nur noch die Eierschale. Schließlich verschwinden auch diese ganz, und man sucht in Infiltraten älteren Datums oft vergebens nach den Eiern, die die erste Veranlassung zur Bildung der Infiltrate waren. Manchmal nimmt man im Zentrum anderer Infiltrate strukturlose, mit Hämatoxylin sich dunkelblauviolett färbende Massen, die verkalkten Reste früher vorhandener Eier, wahr.

In den kleinzelligen Infiltraten verschwinden je länger je mehr die kleinzelligen Elemente, es tritt Granulationsgewebe auf, und nach längerer Zeit ist das kleinzellige Infiltrat in eine Bindegewebsmasse verwandelt, die manchmal bizarre Formen haben kann. Außerdem scheint es, daß, wenn dank der schlechten Zirkulationsverhältnisse, in die die Leber infolge der Gefäßverstopfung geraten ist, Würmer und Eier Leber-



gefäße verstopfen, dies Veranlassung des Absterbens von Lebergewebe und blutiger Infarzierung des abgestorbenen Leberteiles ist. Diese Infarkte sind mikroskopisch klein. Man findet als Folge dieser Embolien nicht so selten Inselchen in Nekrose sich befindenden Lebergewebes, das mit roten Blutzellen infiltriert ist. Im Zentrum dieser Inselchen findet man auch wohl Anhäufung von Hämosiderin. Später werden diese Leberinfarkte durch Bindegewebe organisiert, und trifft man in dem Lebergewebe Bindegewebsmassen an, die im Zentrum Hämosiderin enthalten.

Hämosiderin fand ich ferner noch in sehr vielen Zellen. Kleine Hämosiderinkörnchen, die sich im Plasma der Leberzellen befinden, scheinen für das Leben der Zelle nicht von sehr großer Bedeutung zu sein. Dies verändert sich aber und es hat den Tod der Zelle zur Folge, wenn die im Plasma abgelagerte Hämosiderinmenge größer wird. Die Zelle geht dann nekrotisch zugrunde. Wird das Hämosiderin in miteinander in Verbindung stehenden Zellen in großen Mengen abgelagert, dann geht ein großes Leberstück zugrunde, und auch hierdurch könnte eine Ursache zur Bindegewebsformation geschaffen werden.

Es ist, besonders in meinem Falle, nicht einfach, zu sagen, durch welche Ursache das Hämosiderin in den Leberzellen abgelagert wird. Mein Patient hatte früher viel (vor wie langer Zeit, wußte er nicht bestimmt anzugeben) an Malaria gelitten, und die Möglichkeit ist nicht ausgeschlossen, daß das Hämosiderin mit dieser Krankheit in Zusammenhang steht. In Nieren und anderen Organen (abgesehen von der Milz, worin wenig Hämosiderin nachgewiesen wurde) fehlte es ganz, wohl wurde es aber wieder in den retroperitonealen Drüsen, hauptsächlich in denen, die im verdickten Mesocolon enthalten waren, gefunden.

Das histologische Bild der verschiedenen auf Hämosiderosis untersuchten Organe machte es mir allerwahrscheinlichst, daß die Hämosiderosis der Leber und der retroperitonealen Lymphdrüsen mit dem Parasitismus der Schistosomen in engem Zusammenhange stehen. Dieses Hämosiderin kann der Leber als Endprodukt der Speiseverzehrung der ausgewachsenen Würmer zugeführt werden, die, in der Pfortader lebend, sich mit Blut ernähren. Wegen der großen Anzahl Würmer ist das Quantum Blut, das verzehrt wird, sicher nicht unbedeutend. Außerdem scheint es nach Untersuchungen Yagi<sup>1)</sup>, daß die ausgewachsenen Schistosomen die Eigenschaft besitzen, eine hämolytisch wirkende Substanz auszuscheiden, die die Ursache der schweren Anämieen, Hämorrhagieen, Leber- und Milzanschwellungen, wie man sie bei *Sch. japonicum* antrifft, waren. Bei *Sch. Mansoni* ist die Anwesenheit einer solchen Substanz noch nicht nachgewiesen, die Möglichkeit ist sehr groß, daß sie auch hier vorhanden ist. Ist dies wirklich so, dann könnte auch die durch die Würmer verursachte Hämolyse eine Quelle der Hämosiderinbildung sein.

Natürlich wird es bei folgenden Obduktionen von *Bilharzia*-Fällen darauf ankommen, darauf zu achten, ob die Hämosiderosis der Leber konstant ist.

1) Yagi, S., Ueber das Vorkommen der hämolsierenden Substanz im *Sch. japonicum*, dem Erreger einer in Japan epidemisch auftretenden Krankheit. (Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. 1909 No. 2.)

**Gallenblase.** In der Wand der Gallenblase, besonders in dem Teile, der mit der Leber innig verbunden war, fand ich zahlreiche Eier des *Sch. Mansoni*. Looss gibt an, daß die Eier mit lateralem Dorn in die Fäkalien kommen, indem sie, nachdem sie in der Leber gefangen sind, durch die Wand eines Gallengefäßes in das Lumen dieses Gefäßes dringen und so mit der Galle nach außen (das ist nach dem Darmlumen zu) entfernt werden.

Obwohl ich in keinem der Präparate, die ich von der Galle machte, Eier fand, ist die Möglichkeit, daß Looss Behauptung richtig ist, nicht ganz ausgeschlossen; der normale Weg, dem die Eier folgen, um in die Fäkalien zu kommen, ist es sicher nicht. Präparate der Darmmucosa weisen überzeugend darauf hin, daß eben so wie bei *Sch. japonicum* auch bei *Sch. Mansoni* die Eier durch die Darmmucosa hin in die Fäkalien kommen.

**Därme.** Das Studium einer sehr großen Zahl Schnitte durch verschiedene Teile des Dickdarmes zeigt, daß sowohl zwischen den Drüsenelementen dicht unter der Epithellage, als auch in der Submucosa und der Mucosa, weniger in den Muskelementen, aber hauptsächlich in der Serosa sehr viele Eier gefunden werden. Doch sieht man deutlich, daß Schnitte für das Studium der Eiformen sehr ungeschickt sind. Schon bei Schnitten durch die Leber verursachte es mir einige Male sehr viel Mühe, mit Sicherheit zu entscheiden, ob bei einem bestimmten Ei der Dorn lateral und nicht vielmehr polar gestellt war; allein bei eingehender Prüfung und ausgiebigem Gebrauche der Mikrometerschraube wurde es deutlich, daß in solchen zweifelhaften Fällen polarer Stellung des Dornes diese Stellung nur Schein war, eine Folge des Schnittes durch das Ei, wobei die Richtung nicht durch die Längsachse des Eies ging, sondern mit dieser Achse einen mehr oder weniger scharfen Winkel bildete. Beim Bewegen der Mikrometerschraube konnte deutlich bemerkt werden, wie in solchen zweifelhaften Fällen der Dorn doch lateral befestigt war.

Untersucht man Abschabsel des Lebergewebes und der Darmmucosa, dann findet man, auch nach dem Studium einer sehr großen Anzahl Präparate, niemals anderes als Eier mit sehr deutlich seitlich gestelltem Dorn.

Die Schichten der Darmwand, besonders der Serosa und der Mucosa, sind verdickt, Mucosa, Submucosa und Membrana propria kleinzellig infiltriert.

An vielen Stellen ist es zur Bildung von Geschwüren gekommen. Auf dem Boden dieser Ulcera findet man Eier, die zum Teil ganz ausgestoßen sind, zum Teil noch teilweise in der Membrana propria oder der Mucosa stecken.

Schnitte durch die papillaren Wucherungen der Mucosa zeigen, daß diese aus gewucherter Schleimhaut mit sehr viel Eiern bestehen.

**Mesenterium.** In den Mesenterialgefäßen mit ihren verdickten Wänden findet man viele, meist kopulierte, ausgewachsene Schistosomen. Eier fand ich im Bindegewebe des Mesenteriums nur wenige.

Die Drüsen zeigen das Bild einer einfachen Hyperplasie, enthalten sehr viel Hämosiderin, aber keine Eier.

**Blase.** Die Mucosa ist nicht verändert. Auch die übrigen Schichten der Blasenwand zeigen nichts Abnormales. Weder in den Schnitten noch im Abschabsel der Blase fand ich jemals Eier. Auch in den übrigen

Organen, die ebenfalls mikroskopisch untersucht wurden, wurden keine Eier entdeckt.

Bei der Sektion fand ich ferner, sowohl im Hauptstamm der Vena porta als in den Lebervenen und den Verzweigungen der Pfortader in die Leber, sehr viele Exemplare, männliche sowohl als weibliche, des *Sch. Mansoni*.

Kopulierte Exemplare fand ich nicht nur in den Lebervenen, sondern auch im Hauptstamm der Vena porta, bis dicht bei und sogar in der Leber.

Die meisten der gefundenen Tiere waren noch am Leben und besonders die Männchen führten ziemlich kräftige Bewegungen aus. Bei diesen Bewegungen konnte man Krümmungen und Zusammenziehungen beobachten; die Männchen krümmen sich leicht, so daß Kopf und Schwanzende sich einander nähern, die Weibchen rollen sich zusammen wie eine Spirale, um sich dann wieder langsam zu strecken. Die Würmer erleiden bei alledem nur sehr unbedeutende Platzveränderungen, nur bei den Männchen kann man einen geringen Platzwechsel konstatieren. Die Tiere wurden zum kleinsten Teile lebend untersucht, weitaus der größte Teil wurde fixiert in Pikrinsäure und Sublimatalkohol und nach Färbung mit Boraxkarmin und, nachdem er mit Kreosot durchsichtig gemacht war, untersucht.

In einem vorläufigen Berichte<sup>1)</sup>, den ich erstattete, vertrat ich nach einer oberflächlichen Untersuchung die Ansicht, daß zwischen den Exemplaren des *Sch. haematobium* und *Sch. Mansoni* keine groben anatomischen Unterschiede beständen; eingehendere Untersuchung überzeugte mich aber, daß wenn auch keine groben, dann doch sicher feine anatomische Unterschiede zu konstatieren waren. -- Die Maße der Männchen stimmen mit denen überein, die von Looss und anderen für *Sch. haematobium* angegeben wurden (12—14 mm).

Beim Männchen kann man deutlich einen vorderen und einen hinteren Teil unterscheiden. Der erste ist kurz,  $\pm 7$  mm lang, hinsichtlich des letzteren mehr oder weniger dorsalwärts gebogen und trägt zwei Saugnapfe, einen am peripheren Ende, den Mundsaugnapf, mit kräftig dorsaler und weniger kräftig entwickelter ventraler Lippe, den anderen ungefähr auf der Grenze zwischen Vorder- und Hinterstück, den Bauchsaugnapf. Dieser letztere ist größer als der Mundsaugnapf und mit einem Stiele versehen.

Während der vorderste Teil des Körpers glatt ist, ist der hinterste mit sehr kleinen Beulen besetzt, die ihre teils wieder mit sehr kleinen Stacheln ausgerüstet sind. Dicht beim Uebergange des Vorder- in den Hinterteil sind die Beulen in geringer Zahl vorhanden und liegen weit auseinander. Je mehr man sich aber dem Hinterende nähert, desto zahlreicher werden die Beulen und desto dichter stehen sie beieinander.

Der Darm beginnt bei dem Mundsaugnapf mit einem Oesophagus, gleich bei dem Bauchsaugnapf teilt sich der Darm in zwei Schenkel, die sich später wieder vereinigen und im Hinterende des Tieres blind endigen. Die Testikel sind aus 5—6 (manchmal auch mehr, bis zu 8) Bläschen gebildet, die dicht hinter dem Bauchsaugnapf, hintereinander gelagert, im Beginnstück des Hinterendes liegen.

1) Mededeeling over de werkzaamheden, verricht in het Bakteriologisch Laboratorium te Paramaribo gedurende 1910.

Während der Vorderteil mehr oder weniger walzenrund ist, ist das Hinterende platt, seine freien Ränder sind einander zugekehrt. Hierdurch wird ein Kanal, *Canalis gynaecophorus*, gebildet. Dieser Kanal nimmt bei der Kopulation das Weibchen auf, das gewöhnlich ganz und gar in diesem Kanale verborgen bleibt und nur am Vorderende mit einem kleinen Teile nach außen sieht.

Rodenwaldt<sup>1)</sup> erwähnt, daß bei *Sch. japonicum* die breiten Seitenfelder, die sich zu einem *Canalis gynaecophorus* zusammenfalten, beinahe rechtwinkelig an dem Vorderteile entspringen, während bei *Sch. haematobium* der Vorderteil allmählich in die Seitenfelder übergeht (Fig. p. 197 nach Looss in Braun „Die tierischen Parasiten des Menschen“ und Looss' Artikel „Von Würmern und Arthropoden hervorgerufene Erkrankungen“ in Mense, Handbuch der Tropenkrankheiten, p. 100).

Bei *Schistosomum Mansoni* entspringen die Seitenfelder auf dieselbe Weise, wie von Rodenwaldt für *Schistosomum japonicum* beschrieben ist. Man kann auch hier beobachten, daß der Uebergang vom Vorderteil in die Seitenfelder niemals ein allmählicher ist, sondern daß der obere Rand der Seitenfelder mit den Seitenflächen des Vorderteiles einen mehr oder weniger stumpfen Winkel bildet. In meinem Besitze befinden sich Exemplare, bei denen die Seitenfelder genau rechtwinkelig entspringen.

Die Weibchen stimmen sowohl in der Größe als im grob anatomischen Bau mit der Beschreibung überein, die Looss für das Weibchen des *Sch. haematobium* gegeben hat. Es ist viel länger als das Männchen, haardünn, nur im Vorderteile weiß, sein Hinterteil ist dunkelbraun oder braunschwarz gefärbt. Der Darm beginnt, wie beim Männchen, an der Mundöffnung mit einem einfachen Oesophagus, dicht vor dem Bauchsaugnapf teilt er sich in zwei Schenkel, die sich indessen bald wieder vereinigen und wie eine zickzackförmig gebogene Röhre zwischen den Dottersäcken nach dem Hinterende des Tieres verlaufen, wo der Darm blind endigt.

Der ungepaarte Eierstock liegt ungefähr in der Mitte, mehr der dorsalen als der ventralen Seite (der Seite des Bauchsaugnapfes) genähert. Nach Braun ist die Form des Eierstockes „länglich-oval, bei älteren verdickt sich sein Hinterende kolbig, während das vordere sich verjüngt“. Auch Looss gibt eine ähnliche Beschreibung der Eierstockform.

Bei *Sch. Mansoni* ist, besonders bei älteren Weibchen, der Eierstock gewunden (Fig. 2—5). Besonders Fig. 3 läßt deutlich sehen, wie der Eierstock in Windungen verläuft. Von dem meistens, auch hier, kolbenförmig verdickten Hinterende entspringt der Eileiter, der sich sofort nach oben hin umlegt. Er verbindet sich mit dem Dottergang und stürzt sich in den Ootyp. Der Dottergang verläuft wie eine stark gekrümmte Röhre an der ventralen Seite des Ovariums und geht nach hinten in die Dottersäcke über, die den ganzen Tierkörper, insoweit er von den Därmen freigelassen wird, ausfüllen.

Der Ootyp ist ovalförmig, seine Längsachse bildet einen Winkel mit der Längsachse des Tieres. Die Mündung des Eileiters liegt nicht in

1) Rodenwaldt, Kapitel „Katayama“. (Realenzyklop. d. gesamt. Heilkunde. 4. Aufl.)



der Mitte, sondern, wie Fritsch auch für die Schalendrüsens beschrieben hat, lateral, und zwar liegt die Oeffnung an der ventralen Seite. Auch die Schalendrüsens sind, nicht so wie bei *Sch. haematobium*, symmetrisch, sondern ebenfalls nach der ventralen Seite hin gerückt und haben eine laterale Mündungsstelle in den Ootyp (Fig. 6).

Im Ootyp nicht kopulierter Weibchen findet man meistens ein Ei, dessen seitlich gestellter Dorn gewöhnlich ventral gerichtet ist und wovon die Eiachse einen Winkel mit der Längsachse des Tieres bildet. Gelegentlich wurden auch freie Weibchen mit mehreren Eiern des *Mansoni*-Typus im Uterus und im Ootyp gefunden.

In kopulierten Weibchen ist die Anzahl Eier mit lateral gestelltem Dorn größer. So fand ich in einem Weibchen sechs Eier, alle mit deutlichem Dorn.

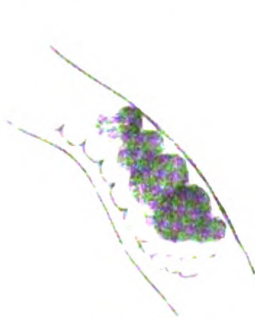


Fig. 2.

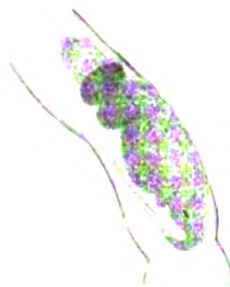


Fig. 4.



Fig. 3.



Fig. 5.

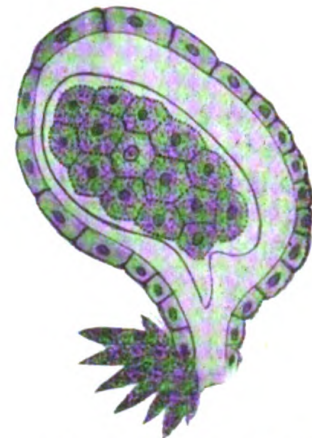


Fig. 6. Schematische Vorstellung des Ootypus mit Einmündung der Schalendrüsens.

Looss erwähnt, daß bereits Bilharz im Uterus eines Exemplares des *Sch. haematobium* sowohl Eier mit terminalem, als auch solche mit lateralem Dorn fand. Ein derartiger Fund würde natürlich direkt für Looss' Meinung plädieren. Diese Mitteilung von Bilharz steht in der medizinischen und zoologischen Literatur vereinzelt da, und Sambon bemerkt im Anschluß an diese Mitteilung von Looss, daß Bilharz kein Ei sah, sondern „that a peculiar brownish-yellow body, furnished with a lateral spine, was found only, within the oviduct of female worm, the posterior of which obtained the ordinary ova“. Sambon weist darauf hin, daß Bilharz sprach von „the ordinary ova“ und nicht von Eiern mit polar gestelltem Dorn und „and his allusion to the single find may refer to the dark-yellowish discoloration rather than to the position of the spine, to which apparently he attaches no importance whatever“.

Wiewohl ich die Eier von p. m. 60 Weibchen, im Ootyp gelegen, untersuchte, wollte es mir niemals gelingen, auch nur einmal ein Ei mit

terminal gestelltem Dorn zu finden, immer wurde der Typus mit lateralem Dorn angetroffen.

Der Ootyp führt in einen Uterus, der in der Mitte gelegen ist, gewunden nach oben verläuft und in den Bauchsaugnapf mündet.

Aus dem oben Angeführten muß schließlich der Schluß gezogen werden, daß die Eier mit terminalem und die mit lateralem Dorn, jede für sich, zu verschiedenen Wurmartarten gehören, und zwar die mit terminalem Dorn zu *Schistosomum haematobium*, die mit lateralem zu *Schistosomum Mansoni*, und zwar aus folgenden Gründen:

1) *Sch. haematobium* hat anders gestaltete Eier als *Sch. Mansoni*.

2) Während beim Männchen des *Sch. haematobium* der Uebergang aus dem Vorderstück in die Seitenfelder ein allmählicher ist, entspringen bei *Sch. Mansoni* die Seitenfelder rechtwinkelig oder beinahe rechtwinkelig vom Vorderstück.

3) Die Ovarien des *Sch. Mansoni* haben stets einen mehr oder weniger stark ausgesprochen gewundenen Verlauf, ein Verhältnis, wie es für keine der anderen *Schistosomum*-Arten beschrieben ist.

4) Der Ootyp liegt asymmetrisch in bezug auf die Längsachse des Tieres, die Mündung der Eileiter ist lateral, an der ventralen Seite, wo auch die Schalendrüsen liegen und münden.

5) *Sch. Mansoni* wohnt als *Sch. japonicum* ausschließlich im Gebiete der Pfortader, *Sch. haematobium* vorwiegend in den Beckenvenen.

6) *Sch. Mansoni* ist Ursache einer Krankheit, deren Symptome völlig mit denen der von *Sch. japonicum* verursachten Katayamakrankheit übereinstimmen, *Sch. haematobium* dagegen führt zu Blasensymptomen, die noch niemals bei *Sch. Mansoni* beobachtet wurden.

7) Die pathologisch-anatomischen Veränderungen weichen bei *Sch. Mansoni* ganz und gar von denjenigen ab, die bei *Sch. haematobium* angetroffen werden, und stimmen vollkommen mit denen der Katayamakrankheit überein.

8) Hierzu kommt schließlich noch die geographische Verbreitung, die, wie Sambon bemerkt, für *Sch. Mansoni* eine ganz andere ist, als für *Sch. haematobium*.

Gegen die Ansicht von Looss, daß die Eier mit seitenständigem Dorn unbefruchtete Eier des *Sch. haematobium* sein sollten, spricht:

a) Daß man in verschiedenen Ländern, unter anderem in Brasilien, auf den Antillen und in Surinam, keine anderen als diese Eier findet. Unter anderem beobachtete ich geraume Zeit lang 15 Patienten und fand niemals etwas anderes, als den Typus mit lateralem Dorn. In diesen Eiern fand ich beinahe immer eine normal entwickelte Eizelle und Dotterzellen und in vielen *Miracidium*, das sich nach Entweichung aus der Eierschale normal verhielt.

b) Die Eier mit lateralem Dorn fand ich als einzigen Typus im Uterus und Ootyp von ungefähr 60 hierauf untersuchten Weibchen. Ebenso wie Loos konnte auch ich im Uterus eines kopulierten Weibchens, gefunden in der Darmvene, Eier mit lateralem Dorn konstatieren.

c) Nimmt man an, daß der laterale Dorneitypus ein unbefruchtetes Ei ist, dann ist es unbegreiflich, wie sich die Krankheit hier verbreitet.



Vom Infektionsmodus der Schistosomen weiß man noch nichts Positives. Looss hat bewiesen, das *Miracidium* in verdünnter Salzsäure nach sehr kurzer Zeit stirbt, so daß eine Infektion per os ausgeschlossen ist. Da er vergebens nach einem wirbellosen Tiere suchte, das als Zwischenwirt hätte fungieren können, bemerkt er, daß die Infektion direkt durch die Haut hin geschieht wenn sich Personen in miracidiumhaltigem Wasser baden.

Paramaribo, Mai 1911.

*Nachdruck verboten.*

## Ueber die Existenz eines spezifischen Präzipitins im Blute der Pellagrakranken <sup>1)</sup>.

Vorläufige Mitteilung.

Von Prof. Guido Tizzoni, Bologna.

Ich habe in meinen vorigen Arbeiten <sup>2)</sup> folgende Tatsachen nachgewiesen:

Daß im Blute, in der Cerebrospinalflüssigkeit und in den Organen von Kranken, die schweren Pellagraformen (pellagröser Typhus, pellagröser Wahnsinn) in kurzer Zeit erlegen sind, ein besonderer Keim (*Streptobacillus pellagrae*) nachweisbar ist, dessen morphologische und kulturelle Charaktere ich ausführlich beschrieben und dessen Pathogenität ich bei Tieren untersucht habe.

Daß man denselben Keim aus den Stühlen von Kranken mit gewöhnlichen Pellagraformen isolieren kann, was mir ein einziges Mal direkt (Stamm Maccaferri) und 12 Mal indirekt, d. h. durch Isolierung aus den Faeces vermittelt Tieren (Meerschweinchen) gelungen ist.

Daß bei den gewöhnlichen vorwiegend langsam verlaufenden Formen von Pellagra das Blut einen ziemlichen Widerstand gegen das Eindringen des Keimes aus dem Darme leistet, so daß es mir in 12 von mir beobachteten und berichteten Fällen nie gelungen ist, direkt aus dem aus der Armvene in reichlicher Menge gewonnenen Blute den spezifischen Keim zu kultivieren.

Daß ich denselben Keim bei 9 Proben von verdorbenem Mais 2mal isolieren konnte.

Daß dieser Keim, welches auch seine Herstammung sei, d. h. sowohl wenn er aus dem Blute akuter oder aus den Faeces gewöhnlicher Pellagrakranken herkommt, wie wenn er aus verdorbenem Mais isoliert wurde, stets pathogen für Meerschweinchen ist und bei diesen stets ein charakteristisches Krankheitsbild hervorruft, bei welchem dieselben Erscheinungen wie beim Menschen in dem Vordergrund stehen.

1) Ins Deutsche übertragen von Dr. med. K. Rühl (Turin).

2) Tizzoni e Fasoli, Saggio di ricerche batteriologiche sulla pellagra. (Memor. d. Accad. d. Lincei. Cl. d. Sci. fis. mat. e natur. Vol. VI. 1906.) — Tizzoni, Intorno alla patogenesi ed etiologia della pellagra. (Bollet. d. Minist. di Agricolt. etc. 1909.) — Tizzoni, Intorno alla patogenesi ed etiologia della pellagra. Seconda serie di ricerche. (Boll. d. Mo. die Agricolt. etc. — Anno VIII. Vol. II. Ser. C. 1909. Fasc. 9.) — Tizzoni, Sulla possibilità di trasmettere la pellagra alla Scimmia. (R. Accad. d. Sci. di Bologna. Ser. VI. T. VIII. 1911.)

Daß bei den Meerschweinchen die Uebertragung der Krankheit sowohl auf subkutanem wie auf dem Wege des Magens geschieht, daß aber die Infektion auf letzterem Wege nur dann stattfindet, wenn bei der Fütterung des Tieres das Maismehl einen großen Platz einnimmt.

Daß der aus dem Menschen isolierte Keim auch für Affen pathogen ist, wenn er diesen subkutan injiziert wird.

Daß die mikroskopischen Veränderungen, die man bei der Pellagra beobachtet, einen besonderen histologischen Typus darstellen, und infolgedessen nicht mit solchen anderer Natur verwechselt werden können, und daß dieser Typus sowohl bei den natürlichen wie bei den experimentell bei Tieren erzeugten Formen der Krankheit konstant vorkommt.

Daß der spezifische Erreger der Pellagra ungeachtet seiner Herstammung stets besondere morphologische und kulturelle Eigenschaften aufweist, die es erlauben, ihn von anderen bekannten Bakterien zu unterscheiden, und daß dieser Keim, obwohl er nicht sporenbildend ist, ziemlich lange Zeit ( $\frac{1}{2}$  Stunde bei 100°) gegen hohen Temperaturen Widerstand leistet<sup>1)</sup>.

Diese Resultate genügen also vollständig den drei Forderungssätzen Kochs:

Nachweis eines bestimmten Mikroorganismus bei der großen Mehrzahl der Kranken;

besondere und konstante morphologische und kulturelle Eigenschaften des Mikroorganismus, die erlauben, ihn leicht von anderen bekannten Keimarten zu unterscheiden;

Uebertragung der Krankheit auf Tiere mit der Entstehung eines charakteristischen experimentellen und anatomischen Bildes, welches dem Krankheitsbilde gleicht, das man beim Menschen beobachtet.

Auch wüßte ich nicht, aus welchem Grunde man in diesem Fall größere Ansprüche als sonst erheben sollte, um so mehr als ich alle Details meiner Untersuchungen ausführlich berichtet habe, so daß ein jeder diese wiederholen und nachprüfen kann.

In der Tat wurden meine Beobachtungen bereits von mehreren Seiten bestätigt, so von Nino Ramella<sup>2)</sup>, Primärarzt in der Provinzialirrenanstalt in Udine, und von Wolfe, James J.<sup>3)</sup> in Amerika, und stehen in gewisser Beziehung auch mit den früheren Beobachtungen von Vassale<sup>4)</sup> im Einklang, der bereits 1891 im Grunde der Lieberkühschen Drüsen, im interglandulären Gewebe und zuweilen sogar in der Tunica submucosa und muscularis einen morphologisch mit meinem identischen Keim beschrieb, und ferner nachwies, daß der Extrakt aus der vorher mit destilliertem Wasser gewaschenen Darmschleimhaut der Pellagrakranken bei Meerschweinchen Krankheitserscheinungen hervorruft, bei welchen, ebenso wie bei den von mir ausgeführten Versuchen, die spastische Lähmung im Vordergrund steht.

Bezüglich der Bestätigung von seiten Ramellas möchte ich er-

1) Meine Arbeit über die Widerstandsfähigkeit des spezifischen Pellagraerregers gegen hohe Temperaturen wird nächstens im „Bollettino del Ministero di Agricoltura“ erscheinen.

2) Ramella, Nino, Ricerche batteriologiche sul sangue del pellagroso. (IV. Congr. Pellagrol. Italiano, 23—25 Settembre 1909.)

3) Wolfe, James J., South. Atlantic Quarterly. Vol. IX. 1910.

4) Vassale, G., Ricerche microscopiche e sperimentali 1889—1891. Sulla enterite pellagrosa in rapporto alla etiologia della pellagra. Reggio Em. 1891.

wähnen, daß ich Gelegenheit hatte, die Präparate dieses Autors zu untersuchen und dabei die vollständige morphologische Identität der in seinen Photogrammen wiedergegebenen Keime mit den meinigen feststellen konnte.

Nichtsdestoweniger habe ich nichts versäumen wollen, was zur Bestätigung meiner Anschauungen beitragen konnte, und mir somit vorgenommen, zu untersuchen, wie sich das Blutserum der Pellagrakranken gegenüber dem von mir isolierten Keim und den Produkten desselben verhält.

Da ich aber nicht über die nötigen Mittel verfügte und ich von der italienischen Regierung nicht die gehoffte Unterstützung bekam, mußte ich meine diesbezüglichen Untersuchungen um einige Zeit verschieben.

Erst heute bin ich in der Lage, die Resultate der ersten Untersuchungen mitzuteilen, die ich bei den wenigen Pellagrakranken ausführen konnte, welche ich, dank der freundlichen Mitwirkung des Herrn Dr. Gagliardi in Molinella, in der Provinz Bologna, sammeln konnte.

Zu diesen Untersuchungen dienten mir 3 Kranke; die beiden ersten haben mir bereits früher Material zu meinen Untersuchungen geliefert und sind in meinen beiden letzten Arbeiten erwähnt; im dritten Fall handelte es sich um eine neue Patientin, M. A. aus Maremorta, welche für mich besondere Bedeutung hat und zum Gegenstand einer besonderen Arbeit werden wird, weil es mir bei ihr zum erstenmal gelungen ist, durch direkte Kultur im Blute einer Kranken mit einer gewöhnlichen Form von Pellagra einen besonderen Keim nachzuweisen, der, seinen morphologischen und kulturellen Eigenschaften nach, ganz identisch mit demjenigen war, den ich aus den Faeces von Kranken mit ähnlicher langsamer Pellagraform isoliert habe, und mit demjenigen, den ich aus dem Blute und den Organen von Tieren isoliert habe, die von ganz akuten, rasch tödlich endenden Formen von Pellagra befallen waren.

Um Mißverständnisse zu vermeiden, halte ich es für zweckmäßig, hier zu betonen, daß ich bei allen meinen früheren Untersuchungen des Blutes der Pellagrakranken mit langsam verlaufenden Formen der Krankheit nur selten mikroskopisch einzelne Keime nachweisen konnte, welche rasch aufquollen und verschwanden, ohne daß ich sie auf neue Nährsubstrate verpflanzen konnte. Nur in einem Fall (Stamm Maccaferri) konnte ich eine dauernde und verpflanzbare Kultur dadurch erhalten, daß ich das Blut, sobald ich einige Bacillenpaare beobachtet hatte und ehe dieselben dem erwähnten Involutionsprozeß anheimfielen, auf Meer-schweinchen verimpfte.

Das Blut, welches zu gegenwärtigen Untersuchungen diente, wurde direkt aus einer Armvene nach sorgfältiger Desinfektion der Gegend in der Menge von 5—6 ccm entnommen, in einem sterilen Reagensglas aufgefangen und zwecks Sedimentierung stehen gelassen. Nach Trennung der beiden Schichten wurde die obere, aus Serum bestehende, mittels einer sterilen Pipette aufgesogen und durch 10 ccm gewöhnlicher Nährbouillon ersetzt, in welcher ich das Gerinnsel lange Zeit liegen ließ.

Das entnommene Serum war ganz klar, zitronensaftähnlich, und erwies sich bei allen ausgeführten Versuchen, und zwar auch in dem-

jenigen, in welchem aus dem Gerinnsel eine reiche Kultur des spezifischen Keimes erhalten wurde, steril.

Mit dem so erhaltenem Serum wurden keine Versuche mit den Pellagrakeimen ausgeführt, weil ich aus meiner Erfahrung wußte, daß diese ganz kurze Zeit nach ihrer Entwicklung infolge bis jetzt unbekannter Ursachen, leicht einer spontanen Agglutination anheimfallen.

Wir mußten infolgedessen unsere Untersuchungen auf die Präzipitationsreaktion beschränken; diese wurde sowohl mit direkt aus dem Blute des Lebenden gezüchteten Kulturen (Stamm Mazzini) wie mit Kulturen aus verdorbenen Mais und sowohl mit 18—20 Stunden alten Kulturen ausgeführt, die von der Oberfläche des Agars entnommen und mit titrierten Aetzkali- oder Kochsalzlösungen titriert wurden, wie mit den Filtraten der entsprechenden Kulturen auf gewöhnlicher Nährbouillon ausgeführt.

Es wurde immer ein niedriger Grad, meistens von 1 : 10 angewendet, weil es sich darum handelte, festzustellen, ob eine bestimmte Erscheinung eintrat, und nicht wie weit sie eintrat. Diese zweite Bestimmung behielt ich mir für weitere Versuche vor.

Aus meinen Untersuchungen konnte ich folgende Schlußfolgerungen ziehen :

Das Serum der untersuchten Pellagrakranken präzipitierte sowohl die Extrakte aus Bacillen aus Agarkulturen, wie die entsprechenden Filtrate der Bouillonkulturen, diese letzteren jedoch in geringerem Maße. Die präzipitierbare Substanz ist infolgedessen kein freies Produkt, sondern ein Bestandteil des Bakterienkörpers (Endotoxin).

Diese Erscheinung beobachtet man sowohl bei Kulturen aus dem Menschen wie bei solchen aus verdorbenem Mais.

Die Natronlösung-Extrakte aus 18—20 Stunden alten Agarkulturen liefern ein reichlicheres Präzipitat als die Extrakte in Kochsalzlösung.

Durch Extrahierung der Bacillen bei hoher Temperatur (ca. einer Stunde bei 100° C) erhält man ein Produkt, welches ein geringeres Präzipitat liefert als die Extrakte, die aus derselben Kultur bei Zimmer- oder bei noch niedrigerer Temperatur (37°—35° C) gewonnen werden, gleichgültig, ob die Extrakte mit Aetzkali- oder mit Kochsalzlösung hergestellt sind. Dies beweist, daß die durch das Serum präzipitierbaren Bestandteile der Kulturen durch hohe Temperaturen größtenteils zersetzt werden.

Der Grad der erwähnten Präzipitation steht in direktem Verhältnisse zu dem Zustande des Kranken, der das Serum geliefert hat. So nahm bei meinen Untersuchungen, ungeachtet der sonstigen Versuchsbedingungen, der Grad der Präzipitation von der schwersten Kranken (Mazzoni), bei der auch eine Reakutisation der pellagrösen Erscheinungen eingetreten war, zum leichtesten Fall (Maccaferri) progressiv ab.

Ich muß hier jedoch hervorheben, daß sich meine Versuche bis jetzt auf nicht-homologe Kulturen beschränken, indem diese auf Nährsubstraten (Agar, Bouillon) gezüchtet wurden, die mit Pferde- oder Ochsenfleisch hergestellt waren, so daß auch bei den Kontrollversuchen, bei denen Blutserum eines gesunden Menschen angewendet wurde, eine ganz leichte Trübung eintrat; diese war aber unendlich schwächer als diejenige, die etwas Serum der Pellagrakranken hervorrief. Während ferner in den Kontrollröhrchen sich bei längerem Stehen nur ein geringer Bodensatz aus feinstem Pulver bildete, war in den anderen ein reichliches Sediment

in Form einer weißen Kupel zu sehen, welches sich beim Schütteln in Form mehr oder minder großer Flocken erhob.

Dieser Unterschied war bei den Extrakten aus Bacillen aus Agarkulturen viel größer als bei den Filtraten aus den entsprechenden Bouillonkulturen.

In unserem Fall gab sich also die in Frage stehende Erscheinung, infolge des Umstandes, daß es sich um Kulturen auf mit dem menschlichen Serum nicht homologem Nährsubstrate handelte, nur durch die verschiedene Menge des Präzipitates kund; der Unterschied aber zwischen dem normalen Serum enthaltenden Kontrollröhrchen und denen mit Pellagrakrankenserum war immer so groß, daß kein Zweifel über die Erscheinung bestehen konnte.

Diese Resultate wurden durch diejenigen bestätigt, die ich mit dem Blutserum eines ausschließlich mit Kulturen aus dem Menschen infizierten Affens erhielt. Das Serum dieses Tieres ergab sowohl mit den Produkten (Extrakten) aus denselben Kulturen, mit welchen das Tier infiziert war, wie mit denen aus den aus verdorbenem Mais isolierten Keimen stets eine deutliche, unzweifelhafte Präzipitation.

Nachdem ich somit diese Tatsachen festgestellt habe, welche die Spezifität des von mir isolierten und als den Pellagraerreger bezeichneten Keimes bestätigen und ferner die vollständige Analogie der Kulturen aus dem Menschen mit denjenigen aus dem verdorbenen Mais beweisen, bleibt es mir noch übrig, zu untersuchen:

1) Welche Methoden und welche Nährsubstrate am meisten dazu geeignet sind, das Phänomen der Präzipitation am deutlichsten nachzuweisen.

2) Welche Tragweite diese Erscheinung hat und ob sie als sicherer Anhaltspunkt zur frühzeitigen Diagnose der Krankheit dienen kann.

Diese Untersuchungen werden nur möglich sein, wenn ich das nötige klinische Material zur Verfügung haben werde.

*Nachdruck verboten.*

## Kann das fixe Hundevirus an Stelle des fixen Kaninchenvirus zur Bereitung von Wutimpfstoff dienen?

Von Prof. Dr. **Claudio Fermi**,

Vorstand des Kgl. hygienischen und antirabischen Instituts zu Sassari.

Wir hatten zu entscheiden, ob das fixe Kaninchenvirus bei der Bereitung von Wutimpfstoff nach Fermi (frisches, durch Phenolzusatz avirulent gemachtes fixes Virus) durch fixes Hundevirus ersetzt werden kann. Es kommt nämlich vor, bei Kaninchenmangel Hundevirus anwenden zu müssen. Ich schritt zu diesem Ersatz erst, nachdem ich festgestellt hatte, daß kein Unterschied in der Impfkraft beider Virus vorhanden ist.

Die betreffenden Versuche bestanden zunächst darin, daß das Immunisationsvermögen beider Virus auf mit Straßenvirus infizierten Ratten geprüft, dann die Kraft des Serums der mit einem oder dem anderen Impfstoff immunisierten Tiere bestimmt wurde.

### A. Immunisationsvermögen von Hunde- resp. Kaninchen-virus.

10 Ratten wurden mit Straßenvirus subkutan infiziert, dann täglich zweimal mit einer 5-proz. Emulsion von fixem Hunde- resp. Kaninchen-virus 15 Tage hindurch immunisiert; sie lebten aber alle ruhig weiter.

Infektions- datum	Zahl der Ver- suchstiere	Impfungs- datum	Impfungs- tage	Im ganzen eingepfift	Behandlung	Ergebnis	
						Paralyse	Tod
a) Immunisationsvermögen.							
21. II.	1	23. II.	4	2 ccm	Serum aus mit Kaninchen- virus 15 Tage hindurch immunisierten Hunden. Injektion n. 48 Stunden		lebt
21. II.	1	23. II.	4	2 "			"
21. II.	2	24. II.	3	1,5 "	dasselbe; Injektion nach 72 Stunden		"
21. II.	1	25. II.	1	0,5 "	dasselbe; Injektion nach 84 Stunden		"
21. II.	1	25. II.	1	0,5 "	dasselbe; Injektion nach 84 Stunden	8. III. 7 vorm.	8. III. 7 nachm.
21. II.	1	23. II.	4	2 "	Serum aus mit 5-proz. Hundevirus immunisier- ten Hunden. Injektion nach 48 Stunden		lebt
21. II.	1	23. II.	4	2 "			"
21. II.	1	24. II.	3	1,5 "	dasselbe; Injektion nach 72 Stunden		"
21. II.	1	25. II.	1	0,5 "	dasselbe; Injektion nach 84 Stunden		"
21. II.	1	25. II.	1	0,5 "	dasselbe; Injektion nach 84 Stunden	8. III. 7 vorm.	8. III. 7 nachm.
21. II.	1	24. II.	3	1,5 "	Kontrolle: Antirabisches Pferdeserum. Injektion nach 72 Stunden		lebt
21. II.	1	24. II.	3	1,5 "			"
21. II.	1	25. II.	1	0,5 "	dasselbe; Injektion nach 84 Stunden		"
21. II.	1	25. II.	1	0,5 "		3. III. 7 vorm.	3. III. 7 nachm.
b) Lyssizides Vermögen des Serums von mit Kaninchenvirus immuni- sierten Hunden.							
22. II.	1				1 ccm 1-proz. f. V. + 0,1 ccm Serum. Injektion nach 24 Stunden		lebt
22. II.	1				2 ccm f. V., sonst wie oben		"
22. II.	1				3 " " " " " "		"
22. II.	1				4 " " " " " "		"
22. II.	1				5 " " " " " "		"
28. II.	2				1 ccm 1-proz. f. V. + 0,5 ccm Serum. Injektion nach 24 Stunden		"
28. II.	2				0,1 ccm Serum, sonst wie oben		"
28. II.	1				0,05 ccm Serum, sonst wie oben		"
28. II.	1				0,05 ccm Serum, sonst wie oben	8. III. 7 vorm.	9. III. 7 vorm.



## b) Lyssizides Vermögen des Serums von mit Hundevirus immunisierten Hunden.

Infektionsdatum	Zahl und Art der Versuchstiere	Infektionsweg	Impfungsmenge	Behandlung	Ergebnis	
					Anfang der Paralyse	Todesdatum
22. II. 1	Ratte	subkutan	1/4 ccm	1 ccm 1-proz. f. V. + 0,1 ccm Serum. Injektion nach 24 Stunden		lebt
22. II. 1	"	"	1/4 "	2 ccm f. V., sonst wie oben		"
22. II. 1	"	"	1/4 "	3 " " " " " "		"
22. II. 1	"	"	1/4 "	4 " " " " " "		"
22. II. 1	"	"	1/4 "	5 " " " " " "		"
28. II. 1	"	"	1/4 "	1 ccm 1-proz. f. V. + 0,5 ccm Serum. Injektion nach 24 Stunden		"
28. II. 1	"	"	1/4 "	0,1 ccm Serum, sonst wie oben		"
28. II. 1	"	"	1/4 "	0,1 ccm Serum, sonst wie oben		"
28. II. 1	"	"	1/4 "	0,05 ccm Serum, sonst wie oben	7. III. 7 vorm.	7. III. 7 nachm.
28. II. 1	"	"	1/4 "	0,05 ccm Serum, sonst wie oben	7. III. 7 nachm.	7. III. 7 nachm.

## B. Immunisations- und lyssizides Vermögen des Serums aus mit Hunde- resp. Kaninchenvirus behandelten Hunden.

a) Immunisationsvermögen. Hunde werden teils mit Hunde-, teils mit Kaninchenvirus immunisiert; das Serum wurde dann auf mit fixem Virus vor 48, 72, 84 Stunden subkutan infizierten Mäusen geprüft.

b) Lyssizides Vermögen. Man bestimmte die von 0,1 ccm Serum in 24 Stunden neutralisierte Menge 1-proz. Virus.

Täglich wurden zwei Impfungen von je 0,25 ccm Serum ausgeführt.

Ergebnis. Kein Unterschied wurde in bezug auf die Immunisationskraft des mit Hunde- oder Kaninchenvirus bereiteten Impfstoffes beobachtet; danach ist der Ersatz von Kaninchen- mit Hundevirus zulässig. In der Tat überlebten alle immunisierten Ratten in beiden Fällen. Auch die Immunisationskraft und das lyssizide Vermögen des Blutserums aus mit einem dieser beiden Virus behandelten Tieren waren in beiden Fällen gleich.

*Nachdruck verboten.*

## Eine einfache Schnellfärbungsmethode von Spirochäten.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Breslau  
(Direktor: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. R. Pfeiffer).]

Von Dr. med. **Tohl Shmamine** aus Tokio.

Es ist eine Tatsache, die ich ebenso wie **Hartmann** und **Mühlens** bemerkt habe, daß die Spirochäten, der Kultur entnommen, nach **Giemsa** sich sehr schlecht färben, obwohl die **Giemsa**-Färbung und ihre Modifikationen an sich für Spirochätenfärbung sehr geeignet sind; die Zahnspirochäten färben sich im Originalpräparat ferner mit **Karbolfuchsin** gut, während sie kultiviert ebenfalls nach den bisherigen Methoden schlecht färbbar sind. Dies stört die Kontrolle der Züchtungsergebnisse sehr.

Zurzeit arbeite ich auf Anregung des Herrn Geheimrat Prof. Dr. R. Pfeiffer über die Züchtung der *Spirochaeta dentium* und der *Spirochaeta pallida*.

Vorläufig konnte ich in 20 Generationen hintereinander Reinkulturen der ersteren erzielen, während mir auf eigens dazu von mir hergestellten Nährböden in 5 Generationen eine Mischkultur der *Pallida* gelungen ist<sup>1)</sup>. Eine ausführliche Mitteilung darüber folgt demnächst.

Da meine Kulturen sowohl der *Spirochaeta dentium* als auch der *Spir. pallida* weder mit den verschiedenen Modifikationen der **Giemsa**-Färbung, noch mit anderen bisher geübten Färbemethoden sich deutlich färben, mußte ich mich bemühen, eine andere Färbungsmethode zu suchen.

Schließlich ist es mir gelungen, eine Methode zu finden, die die verschiedenen Arten von Spirochäten deutlich, schnell und charakteristisch färbt.

Obwohl mich diese Methode vorläufig noch nicht ganz zufriedenstellt, so möchte ich sie dennoch vorläufig ihrer Einfachheit, Schnelligkeit und Deutlichkeit wegen für diagnostische Zwecke, wo es sich um den Nachweis spärlicher, sehr feiner Spirochäten handelt, empfehlen.

In den nach ihr hergestellten Originalpräparaten und Kulturpräparaten kann man den Unterschied zwischen *Spirochaeta pallida* und *Spir. refringens* gut erkennen. Jene erscheint in meiner Färbung viel blasser gefärbt und feiner, diese aber viel intensiver gefärbt und dicker.

Meine Methode führt auch in jenen Fällen zum Ziele, wo die anderen Färbungen im Stiche lassen; ja man kann, wenn man nur wenige Ausstriche zur Verfügung hat, die nach den übrigen Methoden keine Resultate erkennen ließen, durch Entfernung des **Kanadabalsams** oder des **Zedernöls** noch nachträglich durch Färbung nach meiner Methode gutgefärbte Spirochätenpräparate erzielen.

Die Methode der Färbung ist folgende:

1) Fixieren des Ausstriches auf dem Deckgläschen entweder vorsichtig in der Flamme oder besser in **Methylalkohol**.

1) Anmerkung bei der Korrektur: Inzwischen habe ich erst in der 6. Generation eine Reinkultur der *Pallida* bekommen, welche ich seither durch 6 Generationen rein weiterzüchten konnte.

2) Dann tropft man zuerst 3—4 Tropfen von 1-proz. KalilaugeLösung auf das Deckgläschen.

3) Darauf tropft man **sofort**, ohne abzuspülen, einige Tropfen der gewöhnlichen wässerigen Fuchsinlösung (Fuchsin 15 g : 96-proz. Alkohol, davon 1 : 20 Wasser) oder konzentrierter, wässriger KristallviolettLösung.

4) Stehenlassen, ca. 3 Minuten. Während dieser Zeit trübt sich zunächst die Farbe allmählich und man sieht in der Flüssigkeit feine Niederschläge; schließlich entfärbt sich die Flüssigkeit.

5) Abwaschen mit Wasser; trocknen mit Fließpapier; Kanadabalsam; Auflegen auf den Objektträger.

Wenn man die Farbe noch intensiver haben will, so gießt man nach der Beendigung von 4 (vor dem Waschen mit Wasser) wieder neue Farblösung aufs Präparat und wiederholt denselben Prozeß 2 oder 3mal. Oftmalige Wiederholung desselben Prozesses und längeres Stehenlassen schadet nicht.

In derselben Weise kann man auch 4—5-proz. Natriumkarbonatlösung oder konzentrierte Ammoniaklösung statt 1-proz. KalilaugeLösung gebrauchen. Aber die Ammoniaklösung scheint weniger empfehlenswert zu sein. Bei Gebrauch einer 4—5-proz. Natriumkarbonatlösung eignet sich konzentrierte wässrige KristallviolettLösung besser als Fuchsinlösung. Man kann auch 2 und 3 in einem Akt vereinen: Sofort nach der Beendigung von 1 mischt man unter Schütteln die obige Alkalilösung und Farblösung in einem Reagensglase, und gießt schnell auf das Deckgläschen, ehe eine Farbenveränderung der gemischten Flüssigkeit eintritt. In diesem Falle erscheinen Mikroorganismen ein bischen blasser und kleiner, aber schärfer und gleichmäßiger.

Worauf dieser Färbeprozeß beruht, kann ich zurzeit nicht mit Bestimmtheit sagen.

Ich bin aber damit beschäftigt, den Chemismus dieser Färbung zu studieren.

*Nachdruck verboten.*

## Ueber einige Anreicherungs- und Färbemethoden der Tuberkelbacillen im Sputum.

[Aus dem Institut für Infektionskrankheiten (Direktor: Geh. Ober-Med. Rat Prof. Dr. Gaffky, Abteilungsvorsteher: Prof. Dr. Lentz).]

Von **Wilhelm Frei**, freiwilligem Hilfsarbeiter am Institute.

Während bis vor wenigen Jahren die Färbung nach Ziehl-Neelsen fast ausschließlich zur Darstellung der Tuberkelbacillen im Sputum angewandt wurde, sind in der letzten Zeit einige neue Färbemethoden eingeführt worden. Von diesen habe ich die von Much modifizierte Gram-Färbung und die wieder neu aufgenommene Hermansche Färbung einer Nachprüfung unterzogen. Auch zu den früher angewandten Anreicherungsverfahren des tuberkulösen Sputums ist ein bedeutender Zuwachs gekommen, vor allem durch die Antiforminmethode von Uhlenhuth und Xylander (1). Diese und einige andere habe ich nebeneinander an 56 Sputa durchgeprobt, die zum Teil aus dem Untersuchungs-

amt des Instituts, zum größeren Teil, da die eingesandten Sputummengen meist zur Anwendung verschiedener Methoden nicht reichten, aus dem Rudolf Virchow-Krankenhaus stammten.

Die angewandten Anreicherungsverfahren waren:

1) Das Antiforminverfahren nach Uhlenhuth und Xylander (Auflösen des Sputums in 20-proz. Antiformin, Zentrifugieren).

2) Das Antiformin-Ligroinverfahren (2, 3) nach Bernhardt (Auflösen des Sputums in 20-proz. Antiformin, Ausschütteln mit Ligroin, Absitzenlassen).

3) Die Loefflersche Antiformin-Chloroform-Methode (4) (Auflösen des Sputums durch Kochen mit 50-proz. Antiformin, Schütteln mit Chloroform-Alkohol, Zentrifugieren).

4) Die Hammerlsche Methode (5) (Auflösen des Sputums in Ammoniak-Kalilauge, Schütteln mit Aceton, Zentrifugieren).

Name des Patienten	Sputumpräparat gefärbt nach			Präparat aus der Anreicherung, gefärbt nach Ziehl, angereichert nach			
	Ziehl	Herman	Gram	Uhlenhuth	Bernhardt	Loeffler	Hammerl
1) B.	+ 8	+ 8	+ 10				
2) Sch.	+ 1	+ 1	+ 2				
3) H.	+ 5	+ 6	+ 5				
4) Sch.	+ 6	+ 6	+ 5				
5) L.	+ 6	+ 7	? wegen zahlreich. grampos. Kokken				
6) G.	+ 3	+ 3	+ 4	+ 9	+ 5	+ 5	+ 10
7) K.	+ 3	+ 5	+ 4	+ 10	+ 7	+ 9	+ 10
8) H.	+ 5	+ 5	+ 6	+ 9	+ 6	+ 6	+ 8
9) K.	+ 4	+ 4	+ 4	+ 9	+ 6	+ 6	+ 7
10) K.	+ 5	+ 7	+ 6	+ 8	+ 7	+ 7	+ 9
11) H.	+ 1	+ 2	+ 3	+ 6	+ 4	+ 4	+ 7
12) L.	+ 1	+ 1	+ 2	+ 5	+ 3	+ 3	+ 5
13) H.	+ 1	+ 1	+ 1	+ 3	+ 2	+ 2	+ 4
14) L.	+ 4	+ 4	+ 4	+ 8	+ 6	+ 8	+ 8
15) Sch.	+ 2	+ 2	+ 5	+ 8	+ 7	+ 8	+ 8
16) A.	+ 5	+ 5	+ 5	+ 9	+ 7	+ 8	+ 8
17) N.	+ 2	+ 2	+ 2	+ 4	+ 3	+ 5	+ 5
18) W.	+ 2	+ 3	+ 1	+ 8	+ 7	+ 8	+ 8
19) R.	+ 1	+ 2	+ 2	+ 3	+ 3	+ 3	+ 4
20) F.	+ 2	+ 3	+ 3	+ 7	+ 5	+ 8	+ 8
21) St.	+ 2	+ 2		+ 8	+ 6	+ 7	+ 7
22) S.	+ 4	+ 5		+ 7	+ 6	+ 7	+ 7
23) M.	+ 3	+ 3		+ 7	+ 6	+ 6	+ 8
24) M.	+ 5	+ 6		+ 9	+ 8	+ 8	+ 9
25) R.	—	—	—	+ 3	+ 2	+ 3	+ 4
26) T.	—	—	—	+ 2	+ 2	+ 2	+ 2
27) R.	—	+ 1	? wegen zahlreich. grampos. Kokken	+ 1	—	+ 1	+ 1
28) Sch.	—	—	—	+ 1 (im ganzen Präparat 3 Bacillen)	+ 1 (im ganzen Präparat 1 Bacillus)	+ 1 (im ganzen Präparat 1 Bacillus)	+ 2 (im ganzen Präparat 5 Bacill.)
29) Sch.	—	—	—	—	—	—	+ 2

Die aus den Anreicherungen angelegten Präparate wurden nur nach Ziehl-Neelsen gefärbt. Dagegen wurden die Ausstriche des unbehandelten Sputums gefärbt nach

- 1) Ziehl-Neelsen (6),
- 2) Gram in der zweiten Muchschen Modifikation (7) und
- 3) Herman (8) unter Gegenfärbung mit Vesuvin nach Berka (9).

Ueber die Resultate der Untersuchungen gibt die folgende Tabelle Auskunft, in welcher die 29 positiven Sputa angeführt sind. Bei den 5 ersten reicht die eingesandte Menge nicht zur Anwendung der Anreicherungsverfahren aus. Die in der Tabelle gegebenen Zahlen entsprechen den Zahlen des von Gaffky (10) aufgestellten Schemas zur Einteilung der Menge der im Gesichtsfeld aufgefundenen Tuberkelbacillen. Es wurden von jedem Präparat etwa 20 Gesichtsfelder durchgesehen, und stets wurde die gleiche Vergrößerung benutzt (Zeiss-Obj., Imm. 2,0 mm, Ap. 1,30, Okular 2).

### 1. Die Anreicherungen.

Man ersieht aus der Tabelle, daß alle angewandten Methoden eine Anreicherung des Präparates an Tuberkelbacillen bewirken, die mitunter — hier unter 56mal 5mal — dazu führt, daß man beim Durchsehen der Anreicherung Tuberkelbacillen findet, wo beim Originalausstrich in mehreren Präparaten keine zu finden waren. Aber schon hierbei zeigen sich bedeutende Unterschiede in den Methoden. In drei dieser 5 Sputa fand man bei allen Anreicherungsverfahren Tuberkelbacillen, in einem nur nach der Hammerl'schen, in einem nach allen außer der Bernhardt'schen Methode. Wenn man auch aus diesen einzelnen Befunden noch keine sicheren Schlüsse ziehen kann, da es sich eventuell hier um Zufälligkeiten in der Verteilung der Tuberkelbacillen im Sputum handelt, so ergibt doch ein Vergleich der quantitativen Unterschiede bei den anderen 18 untersuchten Sputa dasselbe Resultat. Danach gibt die stärkste Anreicherung am häufigsten die Hammersche Methode. An zweiter Stelle kommt das Verfahren nach Uhlenhuth und Xyländer, in einem größeren Abstände das nach Loeffler und an letzter Stelle steht die Antiformin-Ligroinmethode.

Die Resultate meiner Untersuchungen stimmen mit denen anderer Untersucher überein. Daß das Antiformin-Ligroinverfahren mit Vorteil nur da angewandt wird, wo keine elektrische Zentrifuge zur Verfügung steht, haben unter anderen schon Schulte (11), Finkelstein (12), Kawai (13) festgestellt. Der letztere Autor kommt bei einem Vergleich der hier angeführten Anreicherungsverfahren — allerdings ohne das Loeffler'sche Verfahren — ebenfalls zu dem Schlusse, daß das Hammerl'sche Verfahren die besten Resultate zu liefern scheint. Indessen ist die Ausführung desselben nicht angenehm, da die Homogenisierung nicht immer, wie Hammerl angibt, in wenigen Minuten gelingt, sondern mitunter nur durch sehr intensives Schütteln und nochmaliges Zugießen von Ammoniak herbeigeführt wird, und da es auch leicht zur Verspritzung von Material kommt. Auch wirkt bei der Durchsicht der Präparate störend, daß die übrigen Bakterien nicht aufgelöst sind. Das schnellste und eleganteste Verfahren ist sicher das nach Loeffler, indessen steht es den Resultaten nach hinter der Hammerl'schen und der Uhlenhuth'schen Methode zurück. Der letzteren ist der Vorzug zu geben, wenn man die Tuberkelbacillen nicht abtöten will, also bei



beabsichtigter Züchtung oder zum Tierversuch. Jedenfalls ist es mir nur aus dem Antiforminsediment gelungen, Tuberkelbacillen zu züchten, während ich sie aus dem nach den übrigen Methoden dargestellten Anreicherungsmaterial trotz sorgfältigen Auswaschens nicht züchten konnte.

## 2. Färbungen.

1) Nach Gram. Die Gramfärbung wurde, wie schon erwähnt, in der II. Muchschen Modifikation angewandt. (Färben mit einer Lösung von 10 ccm gesättigter alkoholischer Lösung von Methylviolett B.N. in 100 ccm 2-proz. Karbolwasser. Gefärbt wird entweder 24—48 Stunden lang im Brutschrank von 37° oder durch Aufkochen über der Flamme. Wir wandten das letztere an. Dann 1—5 Minuten Jod-Jodkalilösung; 1 Minute 5-proz. Salpetersäure; 10 Sekunden 3-proz. Salzsäure; Aceton-Alkohol aa. Gegenfärbung mit verdünntem Karbolfuchsin.) Die Tuberkelbacillen erscheinen meist als Reihen von 4—6 Granula. Außerdem kommen einzeln liegende Granula und ganz selten Häufchen derselben vor. Wie anderen Untersuchern ist es auch mir unmöglich gewesen, auf derartige vereinzelte Granula hin die Diagnose Tuberkulose zu stellen, da sie sich weder von kleinen grampositiven Kokken, noch von feinkörnigen Farbstoffniederschlägen mit Sicherheit unterscheiden lassen. Aber auch selbst die im Reihenverband liegenden Granula lassen sich nicht immer von grampositiven Kokkenketten unterscheiden, was auch schon unter anderen Dold (14) und Rosenblat (15) mitteilen. Daher ist dieses Verfahren, obwohl es häufig mehr Tuberkelbacillen zu Gesicht bringt als das Ziehl-Neelsensche, nicht für Sputumuntersuchungen anzuwenden, wenigstens nicht ohne vorherige Auflösung der übrigen Bakterien durch Antiformin, und wurde von mir auch in den zuletzt ausgeführten Untersuchungen No. 21 bis 24 nicht mehr benutzt.

2) Die Färbung nach Herman. Es ist jedesmal frisch eine Mischung von 3 Teilen einer 1-proz. Ammoniumkarbonatlösung in destilliertem Wasser und 1 Teil einer 3-proz. Kristallviolettlösung in 95-proz. Alkohol herzustellen. Mit 6 bis 8 Tropfen dieser Flüssigkeit wird das Präparat über der Flamme erwärmt, bis Dämpfe auftreten, und dann wird noch 1 Minute weiter gefärbt. Entfärbt wird mehrere Sekunden in 10-proz. Salpetersäure, darauf in 95-proz. Alkohol. Dieser wird eventuell mehrmals gewechselt, bis — es handelt sich bei der ursprünglichen Hermanschen Angabe um Färbung von Schnittpräparaten — eine blaßblaue Farbe des Präparates auftritt. Als Gegenfärbung dient eine 1-proz. wässrige oder alkoholische Eosinlösung. Statt dieser Kontrastfärbung bedient sich Caan (7) einer Vorfärbung mit salzsaurem Karmin. Berka wandte die Methode zuerst für Sputumausstriche an und benutzte als Gegenfarbe Bismarckbraun. (Bismarckbraun 2, 95-proz. Alkohol 60, Aqua destillat. 40.) Bei Anwendung der letzten Methode genau nach Hermans Vorschrift zeigten die Tuberkelbacillen nur einen blaßvioletten Farbenton und hoben sich nicht gut vom Untergrund ab. Wenn ich aber etwas kräftiger über der Flamme erhitze, bis die Flüssigkeit stark kochte, so zeigten die Tuberkelbacillen eine prächtige dunkelviolette Farbe und traten aufs deutlichste aus der Umgebung hervor. Bei Anwendung dieser Färbemethode zeigte das Präparat sehr häufig mehr Tuberkelbacillen als nach der Färbung nach Ziehl-Neelsen,



niemals weniger. In Sputum R, No. 27, fand ich in dem Präparat nach Herman noch Tuberkelbacillen, wo in mehreren, nach Ziehl gefärbten Präparaten keine zu finden waren, und sogar auch die Anreicherung nach Bernhardt negativ ausfiel. Bestätigt wurde dieser Befund durch die 3 anderen Anreicherungsverfahren, die nach Ziehl färbbare Tuberkelbacillen lieferten. Zur Spezifität der nach Herman gefärbten Bacillen wäre zu bemerken, daß sie die in der Ziehlschen Färbung auch dargestellte typische Form hatten. Um jedoch sicher zu gehen, daß bei der Hermanschen Färbung lediglich Tuberkelbacillen den violetten Farbenton annehmen, habe ich eine Reihe Sammlungskulturen (*Subtilis*, Milzbrand, Diphtheriebacillen, Staphylokokken, Streptokokken, Typhus, Coli, Meningokokken) sowie verschiedene von mir selbst aus Sputum gezüchtete Bakterien nach dieser Methode gefärbt, nie aber einen positiven Erfolg gehabt. Nur einige säurefeste Bakterien (*Timothee*-, Gras- und *Smegmabacillen*), sowie Sporen (*Botulinus*-Sporen) hielten die violette Farbe. Es entstehen also dieser Färbung die gleichen Schwierigkeiten für die Identifizierung der Tuberkelbacillen, wie den bisher gebräuchlichen Methoden. Da sie aber mehr Tuberkelbacillen zu Gesicht bringt als die Ziehl-Neelsensche Färbung, ist die Hermansche Färbung der Ziehlschen bei der Darstellung der Tuberkelbacillen im Sputum vorzuziehen.

#### Zusammenfassung.

1) Alle 4 angewandten Anreicherungsverfahren zeigen eine Vermehrung der Tuberkelbacillen gegenüber den einfachen Sputumausstrichen.

2) Unter diesen Verfahren ist das beste das Hammerlsche, es folgen das Uhlenhuthsche, das Loefflersche und das Bernhardtsche Verfahren.

3) Das Uhlenhuthsche Verfahren ist anzuwenden, wenn man die Tuberkelbacillen zur Züchtung oder zum Tierversuch lebend erhalten will; die Methode von Bernhardt kann überall da mit Vorteil angewandt werden, wo keine elektrische Zentrifuge zur Verfügung steht.

4) Die Muchsche Färbung ist für die Darstellung der Tuberkelbacillen in dem nicht mit Antiformin behandelten Sputum nicht verwendbar.

5) Die Hermansche Färbung ist der Färbung nach Ziehl vorzuziehen. Es empfiehlt sich jedoch, um eine intensive Violettfärbung der Tuberkelbacillen zu erzielen, bei der Färbung mit der Kristallviolettammoniumkarbonatlösung stark zu erhitzen, bis die Farbflüssigkeit kocht.

#### Literatur.

- 1) Uhlenhuth u. Xylander, Arbeit. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 32. 1909.
- 2) Bernhardt, Dtsche med. Wochenschr. 1909. No. 33.
- 3) Haserodt, Hyg. Rundsch. 1909. No. 12.
- 4) Loeffler, Dtsche med. Wochenschr. 1910. p. 1987.
- 5) Hammerl, München. med. Wochenschr. 1909. p. 1955.
- 6) Ziehl, Dtsche med. Wochenschr. 1883; Neelsen, Lehrb. d. allgem. Pathol. 1894.

- 7) Caan, Centralbl. f. Bakteriolog. Abt. I. Orig. Bd. 49. 1909.
- 8) Herman, Ann. de l'Inst. Pasteur. T. 3. 1889. p. 160.
- 9) Berka, Centralbl. f. Bakteriolog. Abt. I. Orig. Bd. 51. H. 4.
- 10) Gaffky, Mitteil. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 2. 1884.
- 11) Schulte, Med. Klin. 1910. No. 5.
- 12) Finkelstein, Berlin. klin. Wochenschr. 1910. No. 23.
- 13) Kawai, Med. Klin. Bd. 4 u. 5. 1911.
- 14) Dold, Arbeit. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 36. 1911. H. 4.
- 15) Rosenblat, Centralbl. f. Bakteriolog. Abt. I. Orig. Bd. 58. H. 2.

---

**Die Herren Mitarbeiter werden höflichst gebeten, bereits fertiggestellte Klischees — falls solche mit den Manuskripten abgeliefert werden — nicht der Redaktion, sondern direkt der Verlagshandlung Gustav Fischer in Jena einzusenden.**

---

### Inhalt.

- |   |  |
|---|--|
| <p><b>Cardamatis, Jean P.</b>, Observations microbiologiques et histologiques sur 80 cas de fièvre bilieuse hémoglobinurique, p. 378.</p> <p>— —, Observations hématologiques sur 87 cas de mégalo splénie paludéenne, p. 382.</p> <p><b>Chatterjee, G. C.</b>, On the cultivation of black variety of Mycetoma, p. 358.</p> <p><b>Fermi, Claudio</b>, Kann das fixe Hundevirus an Stelle des fixen Kaninchenvirus zur Bereitung von Wutimpfstoff dienen? p. 407.</p> <p><b>Flu, P. C.</b>, Beitrag zur Lösung der Frage, ob Schistosomum Mansoni identisch ist mit Schistosomum haematobium, p. 389.</p> <p><b>Frei, Wilhelm</b>, Ueber einige Anreicherungs- und Färbemethoden der Tuberkelbacillen im Sputum, p. 411.</p> <p><b>Hadley, Philip B.</b>, Studies on fowl cholera. I. A biological study of ten strains of the fowl cholera organism, p. 323.</p> | <p><b>Huntemüller</b>, Befunde bei Maul- und Klauenseuche, p. 375.</p> <p><b>Iivento, A.</b>, Charaktere der aus dem Trinkwasser einiger Schiffe isolierten Vibrionen, p. 344.</p> <p><b>Körmöcsi, Emil</b>, Ueber protozoenähnliche Gebilde des Blutes, p. 366.</p> <p><b>Kulka, W.</b>, Ueber die Bildung phosphorhaltiger Gase bei Fäulnis, zugleich ein Beitrag zur Biologie des <i>B. putrificus</i> Bienstock, p. 336.</p> <p><b>Odaira</b>, Beiträge zur Kenntnis der hämoglobinophilen Bacillen, mit besonderer Berücksichtigung des Bordetschen Bacillus, p. 289.</p> <p><b>Shmamine, Tohl</b>, Eine einfache Schnellfärbungsmethode von Spirochäten, p. 410.</p> <p><b>Stanziale, Rodolfo</b>, Weitere Untersuchungen über die Inokulierbarkeit leprösen Materials in die vordere Augenkammer von Kaninchen, p. 308.</p> <p><b>Tizzoni, Guido</b>, Ueber die Existenz eines spezifischen Präzipitins im Blute der Pellagrakranken, p. 403.</p> |
|---|--|

# Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 61. Heft 6.

Ausgegeben am 30. Dezember 1911.

*Nachdruck verboten.*

## The influence of the products of lactic organisms upon *Bacillus typhosus*.

[Laboratory of Bacteriology and Hygiene, Michigan Agricultural College,  
East Lansing, U. S. A.]

By Miss **Zae Northrup**.

With 2 Figures.

This study was undertaken primarily for the purpose of establishing the maximum longevity of the typhoid bacillus in sour milk, but, from necessity, it has involved problems of technique.

Previous investigations have dealt mostly with the longevity of *B. typhosus* in sweet milk; a few only, with sour milk, buttermilk, butter and cottage cheese.

Concerning the longevity of *B. typhosus* in sour milk, buttermilk, etc., Barthel (2) says: "Typhoid bacteria increase in milk and may remain alive for twenty-five days without a decrease in number due to the formation of acid in the milk", and further "they themselves contribute to this acid production". "In butter, typhoid bacteria are found after ten days, especially in butter which is strongly acid, as this enclosed sour brine is a good nourishing medium".

On the other hand, Bassenge (10) has attempted to show that during the process of cream ripening, the lactic acid produced by fermentation organisms serves to diminish the number of typhoid bacilli present in the cream; and after the cream is thoroughly ripened and churned, the butter after being worked, will contain no living typhoid germs.

The greater number of investigators agree that the lactic fermentation in milk has a deleterious effect, both upon the vitality and longevity of the typhoid bacillus. According to Bassenge (10), Behla (3) and others, when milk, buttermilk, etc., reaches 0.4 per cent lactic acid, typhoid bacilli are killed within 24 hours, although Fränkel and Kister found them living even after 48 hours.

It has been the purpose of the author to deal with the life of *B. typhosus* in sour milk only, limiting the problem in the first experiments to the ascertaining of the amount of lactic acid necessary to check, diminish the number of, or entirely destroy them.

In a preliminary test, measured portions of lactic acid were added to a definite volume of sweet milk in order to produce varying amounts of acid milk in which to grow the typhoid organisms. After a thorough test, this procedure was pronounced unsatisfactory as the addition of any quantity of acid diluted the milk and produced a curd quite dissimilar to that produced by lactic organisms; then, too, other products of lactic fermentation would not be present in this case to influence results; also, when adding pure lactic acid to milk a certain amount combines with the casein, leaving only a portion of the total acid free to act upon the organisms.

## Experiment I.

## Litmus lactose calcium carbonate agar medium.

In the following test, the lactic organisms were allowed to produce their own acid and *B. typhosus* was grown in association with it in sterile milk. Plates were made from time to time as the milk was souring to determine the increase or decrease of typhoid bacteria.

It was not possible to adhere to natural conditions for the development of typhoid bacteria introduced, as the lactic organisms growing in milk, their most favorable nutrient medium, soon outnumbered the typhoid bacilli, necessitating consequently high dilutions for satisfactory plating: the comparatively few typhoid bacteria entering through natural infection would be lost sight of entirely in this way. Because of this condition, the milk was inoculated with a large number of the typhoid organisms and with comparatively few of the lactics.

After a few hours incubation, plates were made in ordinary agar from the combined culture. The 24 hour colonies on these plates were indistinguishable from one another unless microscopic examinations were made.

At this point, it was evident that a medium for differentiating the typhoid and lactic organisms was necessary. To this end, litmus lactose agar containing calcium carbonate in suspension was tried for plating.

This experiment was carried out at some length to determine the efficiency of the special plating medium.

Method of procedure. — The agar for this experiment was made according to the methods advocated in the "Standard Methods of Water Analysis, 1904", for the preparation of litmus lactose agar.

To the clear filtered agar was added 1 per cent of a solution of Merck's purified litmus (7) and washed calcium carbonate in the proportion of 3 grams to 100 cc. of agar<sup>1</sup>). This was stirred until the calcium carbonate was in even suspension throughout the agar, which was then immediately tubed and sterilized.

The medium for the typhoid-lactic culture was freshly separated milk obtained from the college dairy. Its acidity to phenolphthalein was tested and recorded. Each lot of milk was +15°.

200 cc. of the milk was poured into each of several 375 cc. Erlenmeyer flasks and sterilized. Fresh broth cultures of *B. typhosus* and the lactic organism were used in inoculating the milk flasks.

The broth cultures were transferred to the milk flasks by means of sterile 1 cc. pipettes. Dilutions for plating and counting were made in sterile salt solution.

Plates were made directly from the broth cultures in order to determine the number of typhoid and lactic organisms introduced.

After inoculation, the milk flasks were placed in the incubator at 37° C. Having previously found that *B. typhosus* persists in milk after curding, the flasks were allowed to remain in the incubator until the milk had curded, before plating.

The acidity of the milk at the time of plating was determined, and recorded with the day and the hour of plating.

1) In preparing a second lot of agar, calcium carbonate in the proportion of 1 gram to 100 cc. of agar was found to give sufficient density and enable the sub-surface colonies to be seen more easily.

The counts are recorded in the number of organisms per cc. of milk.

Colonies which could not be differentiated were identified by their characteristic growths on other media and by microscopical examination.

The culture of *B. typhosus* used in the following experiments was transferred from the laboratory stock culture and *Bact. lactis acidii* (lab.) was isolated from sour milk by one of the laboratory assistants.

In Tests Nos. I to VI inclusive, litmus lactose agar having calcium carbonate in suspension, was used for plating.

Table I.  
Differential counts on litmus lactose agar +  $\text{CaCO}_3$ .

No. of test	Age of combined culture	Acidity of culture at time of estimate	Number of bacteria in each cubic centimeter of milk at the times specified	
			<i>B. typhosus</i>	<i>Bact. lactis acidii</i> (lab.)
I	0 hrs.	15°	181 688	20 688
	22 hrs.	67°	1 000 000	717 500 000
II	0 hrs.	15°	3 750 000	130 000
	16.5 hrs.	49°	2 375 000	65 575 000
	19 hrs.	59°	2 800 000	136 675 000
III	0 hrs.	15°	1 260 850	149 625
	17 <sup>3</sup> / <sub>4</sub> hrs.	57°	1 375 000	112 470 000
	22 <sup>1</sup> / <sub>4</sub> hrs.	66°	20 000	25 200 000
	40 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> hrs.	73°	None	6 675 000
IV	0 hrs.	15°	3 375 000	134 125
	22 <sup>3</sup> / <sub>4</sub> hrs.	60°	1 100 000	229 170 000
V	0 hrs.	15°	86 250	328 540
	43 hrs.	75°	None	136 750 000
	48 hrs.	76°	"	49 000 000
VI	0 hrs.	15°	325 415	351 500
	18 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> hrs.	69°	5 500 000	695 500 000
	23 <sup>1</sup> / <sub>4</sub> hrs.	79°	None	166 470 000

From the counts recorded above, it may be concluded that the acid produced by the lactic organism has an inhibitive influence upon the typhoid bacteria. The conditions, however, under which this experiment was performed were not wholly satisfactory, and the above conclusion can not be deemed as final.

The litmus lactose agar containing calcium carbonate was not wholly satisfactory as a differentiating medium because of the difficulty in counting the typhoid colonies. The sub-surface colonies were often-times scarcely discernible on account of the suspended particles of the calcium salt. The surface colonies of *B. typhosus* were moist, translucent and bluish rendering them, also, seen with difficulty.

#### Experiment II.

##### Bile salt medium.

In water analysis, a bile salt medium (9) is often used for differentiating *B. typhosus* and *B. coli*. McConkey (8) states that "bile salt media inhibit most of the organisms found in air and soil when the incubation temperature is 37° C and over". He uses lactose in combination with the bile salt to assist in the differentiation.

Relying on the efficiency of this medium for differentiating *B. typhosus* from air, soil, and other microorganisms, and working under the supposition that lactic bacteria would respond in much the same manner as the classes of bacteria mentioned, a bile medium was prepared and tested for trial by plating pure cultures of typhoid and lactic bacteria.

Preparation of the bile medium. — Owing to the fact that no form of bile salts, sodium taurocholate or glycocholate, were available at this time, bile from a freshly slaughtered ox and sheep was substituted. The agar was made in two lots, using the bile of the ox for one lot and the sheep bile for the other.

This medium was prepared as follows; 15 g. of agar was soaked in 500 cc. water over night. In the morning 20 g. peptone and 5 g. salt were dissolved in 100 cc. hot water and added to the agar, which had been digested previously. 20 g. lactose dissolved in 400 cc. hot water was added next. This was divided into equal parts (500 cc. each); to one was added the bile<sup>1</sup>) of the sheep, to the other the ox bile<sup>1</sup>) (about 30 cc. each).

Just before filtering, 1 per cent of a standard solution of Merck's purified litmus (7) was added to each lot of agar.

Broth cultures of the lactic organism and *B. typhosus* respectively were plated on each lot of the litmus lactose bile agar to test its efficiency. The respective colonies could be distinguished readily from one another. The presence of the bile in the medium seemed to inhibit the growth of the lactic organism almost entirely.

Two or three lactic colonies developed upon the ox-bile agar, none upon the sheep-bile agar. The lactic colonies upon the ox-bile agar were very small, round and transparent, resembling a minute drop of water. For positive identification several of these colonies were transferred to broth, incubated until signs of growth were shown and then transferred to litmus milk tubes. The typical lactic reaction took place within 24 hours.

The typhoid bacilli grew well upon both lots of this agar; both the surface and sub-surface colonies were easy to differentiate from those of the lactic.

This differentiation being quite satisfactory, the same experiment was continued, making duplicate plates in ox-bile agar and in "calcium carbonate" agar. The counts for *Bact. lactis acidi* (lab.) were taken from the calcium-carbonate agar and for *B. typhosus* from the bile agar.

From the above table, it will be noted that the lactic acid produced by *Bact. lactis acidi* (lab.) becomes inhibitive to *B. typhosus* from 24—48 hours after inoculation when the acidity at that time has reached 68—80° or over.

It will be noted also, in this table, that a higher degree of acidity and a longer time exists before the inhibitive effect takes place than in the previous table. This is easily accounted for by the fact that more accurate results were obtained by use of the check plates.

Tests I—XII were carried on with *Bact. lactis acidi* (lab.). As we were desirous of obtaining other types of lactic organisms for

1) The gall bladders were obtained from a freshly slaughtered carcass of a sheep and an ox and were brought to the laboratory under sterile precautions, broken separately into sterile deep culture dishes, and placed in cold storage until used.



comparison with the one used in the above experiments, through the courtesy of Dr. Heinemann and Dr. Hefferan of the University of Chicago, we were furnished with several cultures of lactics.

Table II.  
Summary of tests VII—XII inclusive.  
Differential counts on ox-bile and calcium-carbonate agar respectively.

No. of test	Age of combined culture	Acidity of culture at time of estimate	Number of bacteria in each cubic centimeter of milk at the times specified	
			<i>B. typhosus</i>	<i>Bact. lactis acidi</i> (lab.)
VII	0 hrs.	15°	2 034 575	268 293
	22 hrs.	73°	119 000 000	290 000 000
	76.5 hrs.	82°	11 000 000	Counts lost.
VIII	0 hrs.	15°	1 898 000	1 580 000
	23 hrs.	62°	24 467 000	352 000 000
	46.5 hrs.	68°	None	424 000 000
IX	0 hrs.	15°	5 025 000	3 550 000
	21 hrs.	61°	107 000 000	229 800 000
	47 hrs.	70°	None	300 000 000
X	0 hrs.	15°	1 775 000	1 675 000
	23 hrs.	68°	35 200 000	334 100 000
	46 hrs.	80°	650 000	97 000 000
XI	0 hrs.	15°	2 385 000	1 426 250
	39 hrs.	71°	6 500 000	118 000 000
XII	0 hrs.	15°	2 215 000	1 677 500
	26 hrs.	64°	5 400 000	115 000 000

The following are the names of the lactic organisms used in the succeeding experiments:

*Bact. acidi lactici*, Hueppe.  
*Bact. acidi lactici*, Novy.  
*Bact. acidi lactici*, No. 1.  
*Bact. acidi lactici*, No. 2.  
*Strept. lacticus*.

At this time, several different lactic cultures were received from Dr. Harding of the New York Experiment Station at Geneva. Only one was used in the following experiments, *Bact. lactis acidi*, Harding.

As the supply of ox-bile agar was exhausted at this time, the third lot of experiments was carried on with sheep-bile agar.

It will be noted also that the number of typhoid and of lactic microorganisms on each medium is recorded.

At this point, it might be well to note some of the characteristics of the lactic organisms used in the following experiments. *Bact. acidi lactici*, Hueppe, *Bact. acidi lactici*, Novy, *Bact. acidi lactici* No. 1, and *Bact. acidi lactici*, No. 2 produced gas and offensive odor in ordinary broth; no gas or odor was produced by *Strept. lacticus* and *Bact. lactis acidi*, Harding. All the above microorganisms produced acid in litmus milk and eventually curdled it, taking from three to eight days for this to be accomplished. The first four lactics mentioned, grew abundantly on agar; *Bact. acidi lactici*, Novy, and *Bact. acidi lactici*, No. 1 were motile.

Table III.

Differential counts on sheep-bile and calcium-carbonate agar using different lactic bacteria.

O.A. = ordinary agar; S.B.A. = sheep-bile agar; C.C.A. = calcium-carbonate agar.

No. of test	Age of combined culture	Acidity of culture at time of estimate	Medium	Number of bacteria in each cubic centimeter of milk at the times specified		
				B. typhosus	Lactic organisms Count	Designation
XIII	0 hrs.	15°	O.A.	5 175 000	2 523 750	<i>Bact. acidilactici</i> No. 2
	23 hrs.	64°	{S.B.A.	600 000	No record	
			{C.C.A.	8 500 000	583 300 000	
XIV	0 hrs.	15°	O.A.	5 175 000	1 058 750	<i>Strept. lacticus</i>
	23 hrs.	66°	{S.B.A.	None	1 706 500 000	
			{C.C.A.	"	465 830 000	
XV	0 hrs.	15°	O.A.	4 675 000	1 103 750	<i>Bact. lactis acidilactici</i> Harding
	23 hrs.	63°	{S.B.A.	100 000	1 400 000	
			{C.C.A.	6 000 000	253 670 000	
XVI	0 hrs.	15°	O.A.	3 231 250	275 000	<i>Strept. lacticus</i>
	23.5 hrs.	61°	{S.B.A.	19 230 000	559 330 000	
			{C.C.A.	None	558 500 000	
XVII	0 hrs.	15°	O.A.	1 456 250	1 800 000	<i>Bact. acidilactici</i> Hueppe
	50.5 hrs.	64°	{S.B.A.	26 867 000		
			{C.C.A.		34 500 000	
XVIII	0 hrs.	15°	O.A.	2 043 750	1 425 000	<i>Bact. acidilactici</i> Novy
	23.5 hrs.	50°	{S.B.A.	9 500 000	410 000 000	
			{C.C.A.	57 000 000	227 000 000	
XIX	0 hrs.	15°	O.A.	2 043 750	2 280 000	<i>Bact. acidilactici</i> No. 1
	24 hrs.	50°	{S.B.A.	38 500 000	324 000 000	
			{C.C.A.	40 000 000	90 000 000	
	91 hrs.	63°	{S.B.A.	None	None	
XX	0 hrs.	15°	O.A.	2 043 750	2 715 000	<i>Bact. acidilactici</i> No. 2
	16 hrs.	64°	{S.B.A.	85 500 000	602 500 000	
			{C.C.A.	86 000 000	450 000 000	
	91 hrs.	67°	{S.B.A.	None	None	
			{C.C.A.	"	"	

All of the lactic bacteria in Table III grew vigorously on the litmus lactose bile agar, some producing so much acid that the typhoid colonies were colored red also.

In every case, higher counts for *B. typhosus* were obtained on the calcium-carbonate agar than upon the bile agar and in nearly every case greater numbers of lactics were found upon the sheep-bile agar, which results are the reverse of those summarized in Table II.

This bile agar did not prove to be a successful differentiating medium for any of the lactic organisms except *Bact. lactis acidilactici* (lab.).

In only two tests in Table III was the purpose of these tests accomplished, Nos. XIX and XX, in which the typhoid germs (also the lactic) were killed somewhere within 91 hours at 63—67° acid.

These results, however, were utilized later, in further experiments.

A summary of Tables I, II, and III, with regard to the decrease in the typhoid content is found in Table IV; with regard to the total destruction of the typhoid bacteria in Table V.

Table IV.  
Decrease in typhoid content.

No. of test	Time after inoculation	Acidity of milk at the time specified
II	16 $\frac{1}{2}$ hrs.	49°
III	22 $\frac{1}{4}$ hrs.	66°
IV	22 $\frac{3}{4}$ hrs.	60°
VII	76 $\frac{1}{2}$ hrs.	82°
X	46 hrs.	80°

The typhoid bacilli were all killed in the experiments noted in the following table.

Table V.  
Total destruction of typhoid bacteria.

No. of test	Time after inoculation	Acidity of milk at the time specified
III	40 $\frac{1}{2}$ hrs.	73°
V	43 hrs.	75°
VI	23 $\frac{1}{2}$ hrs.	79°
VIII	46 $\frac{1}{2}$ hrs.	68°
IX	47 hrs.	70°
XIV	23 hrs.	66°
XIX	91 hrs.	63°
XX	91 hrs.	67°

The time element in the foregoing tests seems the most pertinent in comparison with the total extermination of the typhoid bacteria in the milk. In only two tests, Nos. VI and XIV, are the typhoid bacilli killed within 24 hours. In test No. III, there is a possibility of their having been killed in 22 $\frac{1}{4}$  hours; in test No. V, the milk was not plated until 43 hours had elapsed; in test No. VIII, the acidity had not risen high enough at the end of 23 hours to kill the typhoid organisms; it probably rose in a short time from 62° to 68°, but was not plated until 46 $\frac{1}{2}$  hours had elapsed; all the typhoid bacilli were probably killed a few hours after the milk reached 68° acid. In the ninth test, practically the same conditions existed as in the preceding one.

### Experiment III.

#### Filtration experiments.

The unsatisfactory results furnished under Experiments I and II seem to demand a complete change of methods. The main difficulty heretofore, has been that of successfully differentiating the typhoid and lactic bacteria by the use of a special medium for plating. To obviate this difficulty, the plan was formulated of growing *B. typhosus* in the products only, of the lactic organisms. The hypothesis is, the products of the lactic bacteria and not the bacteria themselves exert a deleterious influence upon the typhoid bacteria.

The most feasible way of carrying out this plan appeared to be that of growing the lactic organisms in a suitable medium from which they could be easily filtered; the filtrate would thus contain their products in solution and, when properly controlled would be wholly free from organisms. The typhoid bacteria could then be introduced into this germ-

free filtrate and plates made at any time in ordinary agar, thus making the use of a differential medium unnecessary.

Table VI.  
Strept. lacticus.

No. of test	Age of lactic culture	Acidity of lactic culture	Filtered	No. of typhoid bacilli per cc. of filtrate		
				Introduced	Hrs. after inoculation	Count
I	0 hrs.	10°	+	Discarded. Check flask contained Strept. lacticus.		
	72 "	70°				
II	0 "	10°	+	Discarded. Check flask contained Strept. lacticus.		
	72 "	58°				
	12 da.	58°				
III	0 hrs.	10°	+	191 700	19 hrs.	None
	60 "	54°				
	130 "	60°				
	203 "	63°				
	253 "	64°				
IV	0 "	10°	+	58 650	22.5 "	"
	72 "	68°				
	120 "	68°				
V	0 "	15°	+	106 000	22.5 "	"
	28.5 "	60°				
	49 "	60°				
	100.5 "	60°			45 "	"
VI	0 "	15°	+	198 450	26.5 "	"
	28.5 "	60°				
	49 "	61°				
	100.5 "	61°				
VII	0 "	15°	+	247 000	26.5 "	"
	28.5 "	61°				
	49 "	61°				
	100.5 "	61°				

Table VII.  
Bact. lactis acidi (lab.)

No. of test	Age of lactic culture	Acidity of lactic culture	Filtered	No. of typhoid bacilli per cc. of filtrate		
				Introduced	Hrs. after inoculation	Count
I	0 hrs.	10°	+	Discarded		
	168 "	34°				
II	0 "	10°	+	59 550	26 hrs. 53 "	None "
	600 "	42°				
III	0 "	10°	+	82 830	24 " Not plated	183 000 000
	120 "	32°				
	190 "	32°				

Table VIII.  
*Bact. lactis acidi* (from cheese).

No. of test	Age of lactic culture	Acidity of lactic culture	Filtered	No. of typhoid bacilli per cc. of filtrate		
				Introduced	Hrs. after inoculation	Count
I	0 hrs. 240 "	10° 50°	+	57 340	26 hrs. Not plated	9
II	0 " 120 " 192 "	10° 41° 41°	+	156 000	24 hrs. Not plated	1 310 000
III	0 " 72 " 168 "	10° 48° 48°	+	136 700	25 hrs. 48 "	None "

Table IX.  
*Bact. lactis acidi*, No. 226.

No. of test	Age of lactic culture	Acidity of lactic culture	Filtered	No. of typhoid bacilli per cc. of filtrate		
				Introduced	Hrs. after inoculation	Count
I	0 hrs. 120 " 192 " 291 " 339 "	10° 18° 34° 41° 45°	+	64 800	25.5 hrs. Not plated	197 700 000

By a preliminary test, lactose broth was found to be the medium which would best lend itself to the abundant growth of the lactic organisms and permit of filtration of the cultures.

**Medium.** — This broth was made by adding 1½ per cent lactose and 1 per cent peptone to the meat infusion. The first lot of broth was made +10°, the second +15°, nearer perhaps the average acidity of milk. The broth was then placed in 375 cc. Erlenmeyer flasks and sterilized.

**Apparatus.** — The broth cultures of the lactic organisms were filtered through a Pasteur-Chamberland "F" bougie used in connection with Novy's filtering apparatus; Reichel's filtering apparatus was also used in one or two trials.

The lactic organisms used in this series of experiments were *Strept. lacticus*, *Bact. lactis acidi* (lab.), *Bact. lactis acidi* No. 226, *Bact. lactis acidi*, Harding, *Bact. acidi lactici*, "Lactone", *Bact. lactis acidi* (stock), and *Bact. acidi lactici*, No. 2, and in addition, three new cultures received, in the meantime, from the Geneva Experiment Station, *Bact. lactis acidi* (from cheese), *Bact. lactis acidi* (from whey), and *Bact. lactis acidi* (from starter).

**Methods.** — Two or three hundred cubic centimeters of lactose broth were inoculated with a known lactic organism and incubated at 37° C. The acidity of the culture was determined from time to time by titrating with n/20 NaOH. Each sample was boiled before titrating

to expel volatile acids. The exact time of titration and the degree of acidity were recorded each time.

When the maximum acidity had developed, the culture was allowed to remain at least 24 hours longer at 37° C then filtered into a sterile flask (the bougie and flask had been autoclaved 10 minutes at 121° C).

When from 150 to 200 cc. of the broth culture had been filtered, two flasks of sterile lactose broth (50 cc.) were inoculated with 5 cc. of the filtrate and together with the filtrate, incubated at 37° C<sup>1</sup>). If no growth occurred in any of the flasks, a known number of typhoid organisms was introduced into the filtrate which was again incubated at the above temperature.

Table X.  
Bact. lactis acidi, Harding.

No. of test	Age of lactic culture		Acidity of lactic culture	Filtered	No. of typhoid bacilli per cc. of filtrate		
					Introduced	Hrs. after inoculation	Count
I	0	hrs.	10°	+	106 780	26 hrs. 53 "	23? None
	216	"	42°				
	528	"	45°				
II	0	"	10°	+	88 920	30.5 53.3 "	"
	125	"	50°				
	192	"	54°				
	288	"	54°				
III	0	"	10°	+	79 290	29.5 54.5 "	"
	72	"	60°				
	168	"	60°				
IV	0	"	15°	+	58 950	23.5 47.5 "	"
	28.5	"	62°				
	49.5	"	62°				
	100.5	"	62°				
V	0	"	15°	+		24 46.5 "	2 None
	28.5	"	60°				
	49.5	"	60°				
	100.5	"	60°				

Table XI.  
Bact. acidi lactici, "Lactone".

No. of test	Age of lactic culture		Acidity of lactic culture	Filtered	No. of typhoid bacilli per cc. of filtrate		
					Introduced	Hrs. after inoculation	Count
I	0	hrs.	10°	+	178 650	29.5 hrs. Not plated	540 000
	120	"	36°				
	192	"	40°				
	288	"	40°				

1) The check flasks were inoculated with the filtrate to allow the lactic organisms to develop if they passed the filter. They would probably not have been able to grow in the filtrate containing an excess of their own products.



**Table XII.**  
**Bact. lactici acidi (from whey).**

No. of test	Age of lactic culture	Acidity of lactic culture	Filtered	No. of typhoid bacilli per cc. of filtrate		
				Introduced	Hrs. after inoculation	Count
I	0 hrs.	10°				
	96 "	40°				
	166 "	45°				
	264.5 "	48°				
	315 "	48°	+	57 000	22.5 hrs. 51 "	11 610 11 780 <sup>1)</sup>
II	0 "	10°				
	96.5 "	34°				
	166 "	36°				
	264.5 "	40°				
	315 "	40°	+	139 500	19 " Not plated	38 700 000
III	0 "	10°				
	66.5 "	42°				
	164.5 "	47°				
	215 "	47°	+	209 250	22.5 hrs. Not plated	Uncountable

1) See note under Table XVII.

**Table XIII.**  
**Bact. lactis acidi (stock).**

No. of test	Age of lactic culture	Acidity of lactic culture	Filtered	No. of typhoid bacilli per cc. of filtrate		
				Introduced	Hrs. after inoculation	Count
I	0 hrs.	10°				
	96 "	61°				
	168 "	62°				
	264 "	67°				
	312 "	67°	+	221 500	25 hrs. Not plated	None
II	0 "	10°				
	96 "	52°				
	166.5 "	55°				
	265 "	61°				
	315 "	61°	+	43 650	25.5 hrs. 49 "	"
III	0 "	10°				
	68 "	64°				
	167 "	67°				
	316 "	67°	+	2 390	25.5 " Not plated	"
IV	0 "	15°				
	19 "	25°				
	48.5 "	55°				
	70.5 "	61°				
	93 "	61°	+	74 250	22.5 hrs. 49 "	"
V	0 "	15°				
	29.5 "	57°				
	51.5 "	61°				
	74 "	61°	+	47 700	22.5 " 49 "	"

Table XIV.  
Bact. lactis acidi (from starter).

No. of test	Age of lactic culture	Acidity of lactic culture	Filtered	No. of typhoid bacilli per cc. of filtrate		
				Introduced	Hrs. after inoculation	Count
I	0 hrs.	10°	+	69 300	22.5 hrs. Not plated	4
	96 "	52°				
	167 "	56°				
	290 "	59°				
	339 "	59°				
II	0 "	10°	+	108 900	29.5 hrs. 54.5 "	None "
	72 "	56°				
	168 "	61°				
	288 "	61°				
III	0 "	10°	+	37 350	22.5 " Not plated	"
	68 "	63°				
	167 "	65°				
	316 "	65°				
IV	0 "	10°	+	8 240	25.5 hrs. Not plated	"
	75.5 "	66°				
	123.5 "	66°				
V	0 "	15°	+	33 700	24 hrs. Not plated	"
	28.5 "	59°				
	49.5 "	61°				
	101 "	61°				

Table XV.  
Bact. acidi lactici, No. 2.

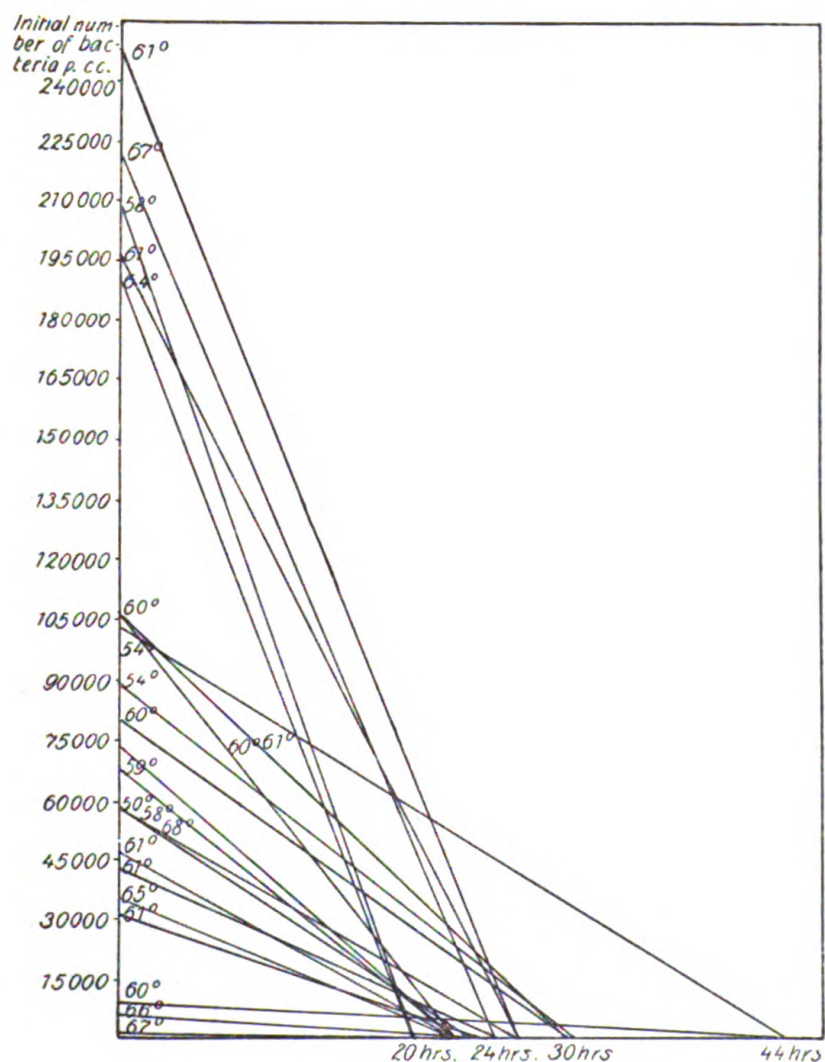
No. of test	Age of lactic culture	Acidity of lactic culture	Filtered	No. of typhoid bacilli per cc. of filtrate		
				Introduced	Hrs. after inoculation	Count
I	0 hrs.	10°	+	155 700	24 hrs. 49 "	12 170 None
	96 "	48°				
	168 "	48°				
II	0 "	10°	+	212 400	19 " 44.5 "	50 None
	68 "	53°				
	167 "	58°				
	316 "	58°				
III	0 "	10°	+	102 150	19 " 44.5 "	175 None
	74.5 "	54°				
	123.5 "	54°				
IV	0 "	15°	+	72 000	24 " 46.5 "	186 None
	28.5 "	40°				
	49.5 "	46°				
	79 "	46°				
	101 "	46°				
V	0 "	15°	+	87 750	24 " Not plated	None
	28.5 "	41°				
	49.5 "	44°				
	79 "	46°				
	101 "	46°				

The number of typhoid bacilli introduced into each cc. of the filtrate was determined as follows: A small portion of an 18—24 hour broth culture of *B. typhosus* was introduced into the filtrate by means of a sterile pipette. There agar plates were then made, using 1 cc., 0.5 cc., and 0.1 cc., respectively of the inoculated filtrate, and the average count taken after a sufficient period of incubation. After 24 hours a second set of plates was made using the same dilutions as before. If the filtrate had become turbid, dilutions of 1—1 000 000, 1—5 000 000 and 1—10 000 000 were used for plating.

If the second plating showed presence of typhoid bacilli in the filtrate, a third set of plates was made, etc.

The following table is a summary of Tables VI to XV. The experiments are arranged according to the degree of acidity produced by the lactic organisms.

From 50° acidity up to 68°, the lactic acid produced by several *lactis*, *Bact. lactis acidii* (from cheese), *Bact. lactis acidii*, Harding, *Bact. acidilactici*, No. 2, *Bact. lactis acidii* (from starter), *Strept. lacticus*, and *Bact. lactis acidii* (stock) is strongly inhibitive to the typhoid organisms; this is graphically illustrated in the following chart:



Curve 1.

Table XVI.

Acid- ity of broth	No. of test	Lactic organism	No. of typhoid bacilli per cc. of filtrate			
			Intro- duced	No. at 2nd plating	No. at 3rd plating	Remarks
32°	III	Bact. lactis aci- di (lab.)	82 830	183 000 000	Not plated	Increased in 24 hrs.
40°	II	Bact. lactis aci- di (from whey)	139 500	38 700 000	" "	Increased in 19 hrs.
	I	Bact. acidi lac- tici, "Lactone"	178 650	540 000	" "	Increased in 29.5 hrs.
41°	II	Bact. lactis aci- di (from cheese)	156 000	1 310 000	" "	Increased in 24 hrs.
42°	II	Bact. lactis aci- di (lab.)	59 550	None	None	Killed within 26 hrs.
45°	I	Bact. lactis aci- di, Harding	106 780	23 ?	"	Killed within 53 hrs.
	I	Bact. lactis aci- di, No. 226	64 800	197 700 000	Not plated	Increased in 25.5 hrs.
46°	IV	Bact. acidi lac- tici, No. 2	72 000	186	None	Killed within 46.5 hrs.
	V	Bact. acidi lac- tici, No. 2	87 750	None	Not plated	Killed within 24 hrs.
47°	III	Bact. lactis aci- di (from whey)	209 250	Uncountable	" "	Increased in 22.5 hrs.
48°	III	Bact. lactis aci- di (from cheese)	136 700	None	None	Killed within 25 hrs.
	I	Bact. lactis aci- di (from whey)	57 000	11 610	11 780	See note 1)
	I	Bact. acidi lac- tici, No. 2	155 700	12 170	None	Killed within 49 hrs.
50°	I	Bact. lactis aci- di (from cheese)	57 340	9	Not plated	Decreased in 26 hrs.
54°	II	Bact. lactis aci- di, Harding	88 920	None	None	Killed within 30.5 hrs.
	III	Bact. acidi lac- tici, No. 2	102 150	175	"	Killed within 44.5 hrs.
58°	II	Bact. acidi lac- tici, No. 2	212 400	50	"	Decreased in 19 hrs.
59°	I	Bact. lactis aci- di (from starter)	69 300	4	Not plated	Decreased in 22.5 hrs.
60°	V	Strept. lacticus	106 000	None	None	Killed within 22.5 hrs.
	III	Bact. lactis aci- di, Harding	79 290	"	"	Killed within 29.5 hrs.
	V	Bact. lactis aci- di, Harding	9 960	2	"	Killed within 46.5 hrs.

1) A fourth plating after incubation for 70 hrs. at 37° C. gave 14 700 colonies per cc. After further incubation (95 $\frac{1}{2}$  hrs.) the broth had become turbid and dilution plates on litmus lactose agar showed approximately 24 700 000 red colonies and 8 700 000 blue colonies per c.c. of filtrate. A few drops of the turbid broth introduced into sterile litmus milk and kept at 37° produced acid in 24 hrs. and eventually curdled the milk.

Table XVI. (Continued.)

Acid-ity of broth	No. of test	Lactic organism	No. of typhoid bacilli per cc. of filtrate			
			Intro-duced	No. at 2nd plating	No at 3rd plating	Remarks
61°	VI	Strept. lacticus	198 450	None	Not plated	Killed within 26.5 hrs.
	VII	Strept. lacticus	247 000	"	" "	Killed within 26.5 hrs.
	II	Bact. lactis aci-di (stock)	43 650	"	None	Killed within 25.5 hrs.
	V	Bact. lactis aci-di (stock)	47 700	"	"	Killed within 22.5 hrs.
	IV	Bact. lactis aci-di (stock)	74 250	"	"	Killed within 22.5 hrs.
	II	Bact. lactis aci-di (from starter)	108 900	"	"	Killed within 29.5 hrs.
	V	Bact. lactis aci-di (from starter)	33 700	"	Not plated	Killed within 24 hrs.
62°	IV	Bact. lactis aci-di, Harding	58 950	"	None	Killed within 23.5 hrs.
64°	III	Strept. lacticus	191 700	"	Not plated	Killed within 19 hrs.
65°	III	Bact. lactis aci-di (from starter)	37 350	"	" "	Killed within 22.5 hrs.
66°	IV	Bact. lactis aci-di (from starter)	8 240	"	" "	Killed within 25.5 hrs.
67°	I	Bact. lactis aci-di (stock)	221 500	"	" "	Killed within 25 hrs.
	III	Bact. lactis aci-di (stock)	2 390	"	" "	Killed within 25.5 hrs.
68°	IV	Strept. lacticus	58 650	"	" "	Killed within 22.5 hrs.

As seen by Table XVI, the same amount of acid as produced by different lactic germs has a different effect on the longevity of the typhoid bacillus (see especially 45° and 48° acid). Whether this is due to the natural variation which takes place in different cultures of the same organism (see 46° and 60° acid) or whether it is due to the difference in the by-products other than lactic acid, of the different lactic organisms, is still a matter of question.

However, a certain uniformity in the inhibitive effect of the fermentation lactic acid is shown by Table XVI. From 60—68° acid, the products of four different lactic organisms kill the typhoid bacteria within from 19 to 30 hours, i. e. within 24 hours on the average.

Table XVII is practically the same as Table XVI. It is arranged, however, to show:

1. The relative inhibitive power of the different lactic organisms used;
2. The relative inhibitive power of the different maximum acidities produced in lactose broth by one lactic organism.

The use of Bact. acidi lactici, "Lactone" was discontinued after the first test as it repeatedly failed to make more than 40° acid in subsequent inoculations into lactose broth.

The use of Bact. lactis acidi (lab.) was discontinued for the same reason, and although Bact. lactis acidi (from whey) produced

considerably more acid than *Bact. acidilactici*, "Lactone" or *Bact. lactis acidilab.*, its inhibitive power was very weak and consequently it also was discarded.

Table XVII.

Lactic organism	No. of test	Acidity of lactic cult.	No. of typhoid bacilli per cc. of filtrate				Remarks
			Introduced	2nd plating	3rd plating		
<i>Bact. acidilactici</i> , "Lactone"	I	40°	178 650	540 000	Not plated		Increased in 29 hrs.
<i>Bact. lactis acidilab.</i>	III	32°	82 830	183 000 000	Not plated		Inc. within 24 "
	II	42°	59 550	None	None		Kill. " 26 "
<i>Bact. lactis acidilab.</i> (from whey)	II	40°	139 500	38 700 000	Not plated		Inc. " 19 "
	III	47°	209 250	Uncountable	" "		" " 22.5 "
	I	48°	57 000	11 610	" 11 780		See note under Table XVI
<i>Bact. lactis acidilab.</i> (from cheese)	II	41°	156 000	1 310 000	Not plated		Inc. within 24 hrs.
	III	48°	136 700	None	None		Kill. " 25 "
	I	50°	57 340	9	Not plated		Decr. " 26 "
<i>Bact. lactis acidilab.</i> , Harding	I	45°	106 780	23?	None		Kill. " 53 "
	II	54°	88 920	None	"		" " 30.5 "
	III	60°	79 290	"	"		" " 29.5 "
	V	60°	9 960	2	"		" " 46.5 "
	IV	62°	58 950	None	"		" " 23.5 "
<i>Bact. acidilactici</i> , No. 2	IV	46°	72 000	186	None		" " 46.5 "
	V	46°	87 750	None	Not plated		" " 24 "
	I	48°	155 700	12 170	None		" " 49 "
	III	54°	102 150	175	"		" " 44.5 "
	II	58°	212 400	50	"		Decr. " 19 "
<i>Bact. lactis acidilab.</i> (from starter)	I	59°	61 300	4	Not plated		" " 22.5 "
	II	61°	108 900	None	None		Kill. " 29.5 "
	V	61°	33 700	"	Not plated		" " 24 "
	III	65°	37 350	"	" "		" " 22.5 "
	IV	66°	8 240	"	" "		" " 25.5 "
<i>Strept. lacticus</i>	V	60°	106 000	"	None		" " 22.5 "
	VI	61°	198 450	"	Not plated		" " 26.5 "
	VII	61°	247 000	"	" "		" " 26.5 "
	III	64°	191 700	"	" "		" " 19 "
	IV	68°	58 650	"	" "		" " 22.5 "
<i>Bact. lactis acidilab.</i> (stock)	II	61°	43 650	"	None		" " 25.5 "
	V	61°	47 700	"	"		" " 22.5 "
	IV	61°	74 250	"	"		" " 22.5 "
	I	67°	221 500	"	Not plated		" " 25 "
	III	67°	2 390	"	" "		" " 25.5 "

*Bact. lactis acidilab.* (from cheese), *Bact. lactis acidilab.*, Harding, and *Bact. acidilactici*, No. 2 illustrate the minimum acidity which destroys typhoid bacteria, which is about 45—46°, or 0.4 per cent lactic acid. This destruction takes place in from 24 to 53 hours according to the above tables.

Observations. — The maximum acidity produced in lactose broth by one lactic organism varies with each inoculation. To illustrate this, the following table has been compiled from Table XVII.

As a rule, the initial number of typhoid bacilli present in the broth, whether large or comparatively few, does not influence the number found at the second plating, whatever the acidity of the broth;



Table XVIII.

Lactic organism	No. of inoculations	Acidity in degrees		
		Minimum	Maximum	Degrees of variation
<i>Bact. lactis acidi</i> (lab.)	2	32°	42°	10°
<i>Bact. lactis acidi</i> (from whey)	3	40°	48°	8°
<i>Bact. lactis acidi</i> (from cheese)	3	41°	50°	9°
<i>Bact. lactis acidi</i> , Harding	5	45°	62°	17°
<i>Bact. acidilactici</i> , No. 2.	5	46°	58°	12°
<i>Bact. lactis acidi</i> (from starter)	5	59°	66°	17°
<i>Strept. lacticus</i>	5	60°	68°	8°
<i>Bact. lactis acidi</i> (stock)	5	61°	67°	6°

e. g., at 46° acid, the broth flask containing the fewer *Bact. acidilactici*, No. 2 still contains an appreciable number at the second plating (24 hours after inoculation), while the other flask having the

Table XIX.

*Bact. lactis acidi* (from starter).  
Grown in 1½ per cent lactose broth.

No. of test	Age of lactic culture	Acidity of lactic culture	No. of typhoid bacilli per cc. in filtrate	
			Age of culture	Count
VI	26.5 hrs.	16°	Introduced	1 422
	31.5 "	20°	7 hrs.	883
	47 "	17°	24 "	287
	54.5 "	22°	31 "	220
	71 "	21°	48 "	60 <sup>2)</sup>
	98 "	26°	72 "	6 <sup>2)</sup>
	119 "	29°	81 "	None <sup>2)</sup>
			120 "	10
			127 "	None
			144 "	2 <sup>2)</sup>
			151 "	2
			168 "	1
			192 "	None
			216 "	"?
			240 "	None
VII	23.5 "	18°	Introduced	19 860
	46 "	22°	7 hrs.	37 935
	71 "	21°	24 "	Uncountable
	95 "	22°	31 "	"
	144.5 "	23°	48 "	Broth turbid
VIII <sup>1)</sup>	166 "	24°		
	21.5 "	28°	Introduced	5 626
	47.5 "	28°	7 hrs.	5 168
	70 "	29°	24 "	5 158
			31 "	5 106
			48 "	9 198
			56 "	16 680
			72 "	96 030
			99 "	Uncountable

1) 5 per cent lactose broth used in the eighth trial.

2) Plates so contaminated that an accurate count could not be made.



greater initial number, contains none. (See Table XV.) This also illustrated at 40° and 48° acid and in a different way at 45° acid (see Table XVI), shows the comparative germicidal properties exercised by different organisms. If lactose broth contains 50° acid or more, a steady and rapid decrease in the number of organisms introduced takes place, seemingly irrespective of the greater or lesser initial number.

#### Experiment IV.

Further experiments in the filtration of the lactose broth cultures of different lactic organisms were carried on for the comparison of the acid produced by each with regard to their relative germicidal powers. Owing to the length of time which elapsed between the inoculation of the filtrate with *B. typhosus* and the second and third platings, the

Table XX.  
*Bact. acidi lactici*, No. 2.  
Grown in 1½ per cent lactose broth.

No. of test	Age of lactic culture	Acidity of lactic culture	No. of typhoid bacilli per cc. in filtrate	
			Age of culture	Count
VI	71 hrs.	28°	Introduced	7 768
			7 hrs.	4 626
			24 "	5 463
			31 "	5 850
			48 "	5 060
			55 "	4 893
			72 "	5 330
			79 "	2 100 <sup>1)</sup>
			96 "	4 165
			120 "	2 926 <sup>2)</sup>
			129 "	2 435 <sup>2)</sup>
			216 "	5 786
			264 "	Broth turbid
VII <sup>1)</sup>	21 hrs.	27°	Introduced	2 413
			7 hrs.	887
			24 "	771
			32 "	627
			48 "	456
			75 "	84
			96 "	27
			103 "	4
			120 "	2
			144 "	None
VIII <sup>1)</sup>	23 hrs.	34°	Introduced	21 510
			23 hrs.	13 643
			30 "	17 750
			47 "	39 870
			54 "	51 795
			71 "	38 475
			78 "	42 615
			95 "	37 885
			103 "	49 080
			119 "	59 220
			126 "	58 050
			143 "	65 500
			168 "	Contaminated with molds

1) Grown in 5 per cent lactose broth.

2) See note 2 under Table XIX.

time in which the destruction of the typhoid bacilli took place was not sufficiently defined. This was remedied by plating at 7, 24, 31, 48 etc., hours after inoculation.

**Organisms.** — The lactic organism, *Bact. lactis acidii* (from starter) is now a weak lactic, while *Bact. lactis acidii* (from sour milk) represents the typical lactic; *Bact. acidii lactici*, No. 2 produces acid and gas in broth, also in milk; *Bact. lactis acidii*, 53 B2 is a lactic acid-producing organism isolated from a sample of milk which contained nearly 2 per cent lactic acid; it also possesses the power at times of producing slimy milk; *Bact. bulgaricum* was isolated from a culture of Yoghourt imported from Holland.

These microorganisms were taken as a fair representation of the most common diverse types of lactic organisms.

Table XXI.  
*Bact. lactis acidii*, 53 B2.  
Grown in 1½, per cent lactose broth.

No. of test	Age of lactic culture	Acidity of lactic culture	No. of typhoid bacilli per cc. in filtrate	
			Age of culture	Count
I	39.5 hrs.	21°	Introduced	11 106
	47.5 "	28°	7 hrs.	9 118
			24 "	Broth turbid
II	112 hrs.	56°	Introduced	1 253
			7 hrs.	1 762
			24 "	1 400
			32 "	1 596
			48 "	1 368
			55 "	1 145
			76 "	1 393
			96 "	2 088
			103 "	4 475
			120 "	36 090
			127 "	63 945
			144 "	75 060
			151 "	105 390
			168 "	Uncountable
III	23 hrs.	19°	Introduced	7 700
	46 "	30°	7 hrs.	None
	62 "	44°	24 "	"
	78 "	58°	31 "	"
	99.5 "	68°	48 "	"
IV 1)	21 hrs.	22°	Introduced	381
	47.5 "	49°	2 hrs.	None
	70.5 "	59°	4 "	"
	94 "	68°	6 "	"
	118 "	72°	8 "	"
V 1)	23 hrs.	26°	Introduced	765
	28 "	26°	7 hrs.	20
	48 "	35°	24 "	None
	71 "	57°	31 "	"
	96 "	60°	48 "	"
			55 "	"
			72 "	"

1) Grown in 5 per cent lactose broth.

The outline for this experiment differs somewhat from that in the previous filtration experiment.

Medium. — In the first two or three tests  $1\frac{1}{2}$  per cent lactose broth ( $+18^{\circ}$ ) was used; broth ( $+15^{\circ}$ ) containing 5 per cent lactose was used for the concluding tests as being nearer the lactose content of milk.

Table XXII.  
Bact. lactis acidi (from sour milk).  
Grown in  $1\frac{1}{2}$  per cent lactose broth.

No. of test	Age of lactic culture	Acidity of lactic culture	No. of typhoid bacilli per cc. in filtrate	
			Age of culture	Count
I	23 hrs.	$18^{\circ}$	Introduced	7 645
	46 "	$37^{\circ}$	8 hrs.	3 890
			28 "	214
			48 "	12
			55 "	2
			72 "	2
			79 "	None
			144 "	"
			168 "	"
				"
II	23 hrs.	$33^{\circ}$	Introduced	3 898
	39 "	$42^{\circ}$	7 hrs.	None
			24 "	"
			31 "	"
III	49.5 hrs.	$42^{\circ}$	Introduced	2 813
			7 hrs.	528
			24 "	None
			31 "	"
			48 "	"
IV <sup>1)</sup>	21.5 hrs.	$39^{\circ}$	Introduced	10 496
			7 hrs.	7 823
			24 "	2 385
			31 "	1 814
			48 "	82
			55 "	13
			72 "	1
			79 "	None
			96 "	"
			104 "	"
V <sup>1)</sup>	23 hrs.	$27^{\circ}$	Introduced	8 365
	28 "	$35^{\circ}$	12 hrs.	4 303
			25 "	2 333
			48 "	15 370
			55 "	54 145
			72 "	1 000 000
			79 "	Uncountable
			96 "	Broth turbid
VI <sup>1)</sup>	48 hrs.	$44^{\circ}$	Introduced	8 787
	70 "	$51^{\circ}$	7 hrs.	504
			24 "	None
			31 "	1 ?
			48 "	None
			55 "	"
			72 "	"

1) Grown in 5 per cent lactose broth.

Method. — About 200 cc. lactose broth (+18°) was inoculated with the lactic culture and incubated at room temperature (21–25° C). The acidity was tested from time to time, and when the culture had reached 40° acid or thereabouts, it was immediately filtered. The filtrate was separated into two parts by means of a sterile pipette, and transferred into sterile flasks, every precaution being taken to keep it from being contaminated.

Table XXIII.  
*Bact. bulgaricum.*  
Grown in 5 per cent lactose broth.

No. of test	Age of lactic culture	Acidity of lactic culture	No. of typhoid bacilli per cc. in filtrate	
			Age of culture	Count
I	47.5 hrs.	23°	Introduced	53 580
	70.5 "	26°	24 hrs.	880 200
	94 "	28°	31 "	Broth turbid, not plated
II	23 hrs.	34°	Introduced	18 360
			12 hrs.	77 850
			24 "	Broth turbid
III	22 hrs.	25°	Introduced	6 280
	48 "	26°	7 hrs.	708
	95.5 "	53°	24 "	152
			31 "	85
			48 "	1
			55 "	None

Table XXIV.  
Summary of Tables XX—XXIII.

Lactic organisms	No. of test	Acidity of lactic culture	No. of typhoid bacilli per cc. in filtrate		
			Introduced	Age of culture	No. of <i>B. typhosus</i> present
<i>Bact. lactis acidi</i> (from starter)	VII	24°	19 860	24 hrs.	Uncountable
	VI	29°	1 422	288 "	1
	VIII	29°	5 626	99 "	Uncountable
<i>Bact. acidi lactici</i> No. 2 <sup>1)</sup>	VI	28°	7 768	264 "	Broth turbid
	VII	30°	2 413	144 "	None
	VIII	34°	21 510	168 "	(See Table XX)
<i>Bact. lactis acidi</i> 53 B2	I	28°	11 106	24 "	Broth turbid
	II	56°	1 253	168 "	Uncountable
	V	60°	765	24 "	None
	III	68°	7 700	7 "	"
	IV	72°	381	2 "	"
<i>Bact. lactis acidi</i> (from sour milk)	V	35°	8 365	79 "	Uncountable
	I	37°	7 645	79 "	None
	IV	39°	10 496	79 "	"
	II	42°	3 898	7 "	"
	III	42°	2 813	24 "	"
	VI	51°	8 787	48 "	"
<i>Bact. bulgaricum</i>	I	28°	53 580	31 "	Broth turbid
	II	34°	18 360	24 "	" 1 "
	III	53°	6 280	48 "	"

1) These organisms produced their maximum acidity in each trial recorded.

Both flasks were incubated at 37° C for 48 hours to give any organisms present a chance to assert themselves<sup>1</sup>).

If no growth occurred in either flask, one was inoculated with a known number of typhoid germs, the second flask being sealed and kept for control.

The time for plating was kept as nearly constant as possible, the time being, 7, 24, 31, 48 hours, etc., after inoculation of the filtrate. Plating was continued as long as the filtrate remained clear or until the typhoid germs were all destroyed.

The plates were kept at 37° C for 24 hours, then at room temperature for 48 hours before the final count was taken.

Table XXV.  
Germicidal power of the five lactic organisms compared.

	Acidity	Time
Bact. lactis acidi (from starter) does not kill B. typhosus	At 28—29°	Within 288 hrs.
Bact. acidi lactici, No. 2 killed B. typhosus in 1 out 3 experiments	" 30°	" 144 "
Bact. lactis acidi, 53 B2 killed B. typhosus	" 60°	" 24 "
	" 68°	" 7 "
	" 72°	" 2 "
Bact. bulgaricum killed B. typhosus	" 53°	" 55 "
Bact. lactis acidi (from sour milk) killed B. typhosus	" 37°	" 79 "
	(in 2 expts.)	
	At 42°	" 7 "
	" 42°	" 24 "
	" 51°	" 24 "

In the above summary, the following will be noted: The relative production of acid by the different lactic organisms, Bact. lactis acidi (from starter), Bact. acidi lactici, No. 2 producing their maximum in each trial; the relative efficiency of the acid produced by each as a germicide. The germicidal power of each lactic is compared in Table XXV.

The following curve illustrates the above table.

Production of acid in lactose broth and inhibitive powers of the lactic acid produced by different organisms contrasted.

Conclusion: The time required for inhibition to take place is in inverse proportion to the minimum acidity producing inhibition.

#### Observations.

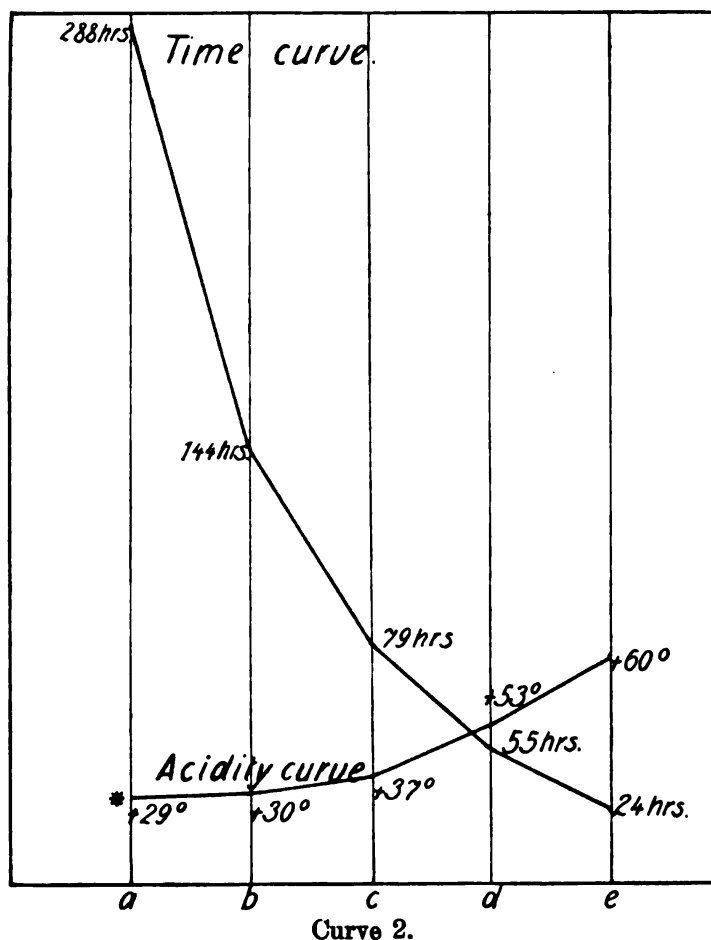
1. The typical lactic organism, Bact. lactis acidi (from sour milk) produces an acid which is inhibitive to B. typhosus in smaller quantities than the acid produced by any other of the above organisms. The minimum acidity recorded which destroys B. typhosus is 37°, or 0.33 per cent lactic acid.

2. The acid produced by Bact. lactis acidi, 53 B2, and Bact. bulgaricum reaches nearly twice 0.33 per cent before it is capable of destroying B. typhosus.

1) Check flasks (as in note p. 426) were not necessary as the lactic organisms were not allowed to produce enough of their own products (i. e. their maximum acid) to inhibit any organisms which might pass through the filter.

3. The lactic, *Bact. lactis acidii* (from starter) and the gas producer, *Bact. acidilactici*, No. 2 have a very uncertain inhibitive effect probably due to their failure to produce sufficient acid.

The acid produced by the most typical lactic organism is the most effective germicide for *B. typhosus* in lactose broth.



- Curve 2.
- a = *Bact. lactis acidii* (from starter).
  - b = *Bact. lactis acidii*, No. 2.
  - c = *Bact. lactis acidii* (from sour milk).
  - d = *Bact. bulgaricum*.
  - e = *Bact. lactis acidii*, 53 B2.

Acidity curve shows the minimum acidity producing total inhibition.

Time curve shows the minimum hours recorded, for inhibition to take place.

\* = One typhoid colony found at the time recorded above.

### Experiment V.

Having reached such definite conclusions with regard to the germicidal power or inhibitive effect of the acid produced by these different lactic organisms in lactose broth, it becomes necessary to establish a relationship between lactose broth, and milk with reference to the relative amount of lactic acid which may be produced by these different lactic organisms in the different media. Whey was compared relatively with lactose broth and milk.

The following data, establishing the above, concludes this series of experiments.

Table XXVI.  
Comparative germicidal power of varying amounts of lactic acid.

Acidity of lactic culture	Lactic organism	No. of test	Remarks
28°	Bact. lactis acidi (from starter)	VII <sup>1)</sup>	On typhoid colony developed on "1 cc." plate at the end of 8 days.
	"	X	Decreased in 7 hours; remained the same for 31 hours; increased.
29°	Bact. acidi lactici No. 2	VI	Decreased in 7 hours; fluctuated for 216 hours, then increased.
	"	VII	Decreased in 7 hours; fluctuated for 72 hours, then increased gradually.
	"	VIII <sup>1)</sup>	Typhoid bacilli killed within 144 hours.
30°	Bact. lactis acidi 53 B2	I	Decreased in 7 hours; immediate and rapid increase.
	Bact. bulgaricum	I	Increased rapidly; no decrease.
34°	Bact. lactis acidi (from sour milk)	V	Decreased in 24 hours; rapid increase.
35°	Bact. bulgaricum	II	Increased rapidly; no decrease.
37°	Bact. lactis acidi	I	Killed within 79 hours.
39°	(from sour milk)	III	" " 79 "
42°	"	II <sup>1)</sup>	" " 7 "
	"	IV <sup>1)</sup>	" " 24 " (probably within 12 hours. See Curve 2).
51°	"	VI	Killed within 24 hours (probably within 12 hours. See Curve 2).
53°	"	III	Killed within 55 hours.
56°	Bact. lactis acidi 53 B2	II <sup>1)</sup>	Checks multiplication for 55—80 hours; then rapid increase.
60°	"	V <sup>1)</sup>	Killed within 24 hours.
68°	"	III	Killed within 7 hours.
72°	"	IV <sup>1)</sup>	Killed within 2 hours.

The following table gives the average of Table XXVII with the corresponding percentages of acid produced in the different media.

From this table the amount of acid required for destroying *B. typhosus* in milk may be theoretically estimated.

#### Conclusions.

The minimum acidity produced by *Bact. lactis acidi* (from sour milk) which will destroy *B. typhosus* is +37° in lactose broth. This corresponds to 80° acid in milk and 28° acid in whey.

The minimum inhibitive acidity produced by *Bact. bulgaricum* is +53° in lactose broth. This corresponds to 208° acid in milk and to 66° acid in whey.

The above amounts of acid in milk corresponding to the acidity produced in whey and lactose broth by the same organism are theoretically the minimum acidities at which the typhoid bacteria will be killed.

1) Less than 5000 typhoid bacteria introduced into each cc. of the filtrate.



However, in raw milk, the medium of natural infection, many factors enter which are never constant, e. g., the character of the initial microbial flora, the flora gained by the necessary exposure to sources of contamination, and the temperature conditions under which the milk is kept after being strained.

If certain species of microorganisms are present in milk, they may, either by growing in association with the lactic bacteria, or by some of their own metabolic products cause a more rapid destruction of the typhoid organisms than the lactic bacteria are capable of causing alone. Or, on the contrary, certain species of bacteria may predominate which will check the production of acid by the lactic bacteria, some even living in symbiotic relationship with *B. typhosus*.

It is very probable that some one of these conditions will occur in the greater number of infected milk samples since milk infected with

Table XXVII.  
Relative acidity produced by lactic organisms in 5 per cent  
lactose broth, whey and ordinary milk.

Bact. bulgaricum				Bact. lactis acidi (from sour milk)				Bact. lactis acidi, No. 4			
Age of lactic culture	Media			Age of lactic culture	Media			Age of lactic culture	Media		
	Milk	Broth	Whey		Milk	Broth	Whey		Milk	Broth	Whey
4 da.	281°	26° <sup>1)</sup>	82°	4 da.	105°	55°	39°	4 da.	68°	51°	30°
7 "	299°	115°	87°	7 "	114°	53°	37°	7 "	82°	55°	31°
10 "	309°	117°	88°	10 "	111°	53°	37°	10 "	87°	53°	31°
13 "	310°	117°	87°	13 "	113°	53°	35°				
4 "	291°	26° <sup>1)</sup>	83°	4 "	112°	52°	37°	4 "	70°	49°	31°
7 "	309°	107°	83°	7 "	113°	53°	38°	7 "	83°	52°	32°
10 "	321°	104°	84°	10 "	108°	54°	39°	10 "	87°	54°	32°
13 "	321°	107°	89°	13 "	101°	54°	39°				
4 "	218°	76°	100°	4 "	112°	48°	41°	4 "	69°	52°	32°
7 "	314°	82°	103°	7 "	113°	49°	41°	7 "	86°	52°	34°
10 "	318°	88°	109°	10 "	112°	52°	41°	10 "	86°	52°	34°
4 "	315°	50°	99°	4 "	114°	49°	38°	4 "	83° <sup>2)</sup>	51°	34°
7 "	318°	56°	104°	7 "	119°	51°	39°	7 "	91°	52°	35°
10 "	328°	60°	108°	10 "	119°	51°	39°	10 "	97°	53°	35°
4 "	299°	42°	94°	4 "	114°	48°	41°	4 "	80° <sup>2)</sup>	49°	32°
7 "	310°	45°	99°	7 "	116°	50°	42°	7 "	89°	52°	35°
10 "	310°	62°	104°	10 "	115°	50°	44°	10 "	90°	53°	35°
4 "	303°	51°	99°	4 "	115°	48°	38°	4 "	81° <sup>2)</sup>	50°	35°
7 "	312°	61°	101°	7 "	116°	51°	41°	7 "	94°	51°	33°
10 "	318°	102°	106°	10 "	117°	53°	43°	10 "	95°	52°	34°

1) *Bact. bulgaricum* was grown in old broth that was slightly concentrated (18° +). This may have caused the exceptionally high acidity.

The first 4 days the culture was kept at 21° which accounts for the low acidity at 1). Afterwards these and the remaining cultures of this organism were kept at 37° C. The temperature seemed to have a marked effect on the production of acid in the whey cultures.

2) Milk was used in these tests in which the lactose had been decomposed in the process of sterilization. It has been observed that superheated milk (brownish in color), registers an amount of acid appreciably greater than that in unheated or in properly heated sterilized milk.

3) Contaminated with molds. Cultures discarded.

Table XXVIII.

Name of organism	Maximum average acidity			Percentage of maximum acidity produced in		
	Milk	Broth	Whey	Milk	Broth	Whey
<i>Bact. bulgaricus</i>	314°	80°	101°	100	25.5	32
<i>Bact. lactis acidii</i> (from sour milk)	113°	52°	39°	100	46	34.5
<i>Bact. lactis acidii</i> No. 4	89°	52°	33°	100	58	37

typhoid bacteria must have been subjected to sources of contamination from which a varied flora would be acquired.

Thus, while this series of experiments brings out some very interesting facts in regard to the influence of fermentation lactic acid upon typhoid bacilli, the many factors entering under natural conditions prevent any definite conclusions being made when these natural conditions exist.

#### Bibliography.

- 1) Swithinbank and Newmann, Bacteriology of milk. p. 314.
- 2) Barthel, Chr., Bakteriologie des Meiereiwesens. p. 116.
- 3) Weigmann, H., Herkunft der Bakterien der Milch. (Lafars Handb. d. techn. Mykol. Bd. 2. p. 36—39.)
- 4) Bruck, C., Experimentelle Beiträge zur Frage der Typhusverbreitung durch Butter. (Centralbl. f. Bakteriolog. Abt. I. Refer. Bd. 34. p. 778.)
- 5) Bolley and Field, *Bacillus typhi abdominalis* in milk and butter. (Centralbl. f. Bakteriolog. Abt. II. Bd. 4. p. 881.)
- 6) Oregon Bulletin. No. 71. p. 179—184.
- 7) Brown, C. W., Litmus media. (47th Ann. Rep. Michigan Board of Agricult. p. 127—129.)
- 8) McConkey, A. T., Bile salt media and their advantages. (Journ. of Hyg. Vol. 8. p. 322.)
- 9) Jackson, D. D., Sawin, L. R., Weston, R. S., and Tarbett, R. E., The use of lactose bile medium. (Journ. of Infect. Dis. Suppl. 3. p. 30, 33 and 39 respectively.)
- 10) Bassenge, R., Das Verhalten der Typhusbacillen der Milch und deren Produkten. (Dtsche med. Wochenschr. Bd. 29. 1903. p. 675—676, 697—700.)

*Nachdruck verboten.*

### Ein Beitrag zur Aetiologie des fötiden Eiters.

[Aus der Kaiserl. chirurgischen Universitätsklinik Kyoto, Japan  
(Prof. H. Ito).]

Von Dr. Y. Ozaki, Assistenten der Klinik.

Mit 1 Figur.

Obschon die Wundinfektionen dank der modernen, gut ausgebildeten Anti- und Asepsis zu einem recht seltenen Ergebnis geworden, sind sie dennoch ab und zu noch in der Praxis anzutreffen. Unter diesen chirurgischen Infektionen kennen wir eine Reihe von Fällen, welche wegen ihres eigenartigen semeiologischen Bildes besondere Aufmerksamkeit auf sich lenken und sich als putride Infektionen kennzeichnen. Die Krankheitserreger derselben sind in der Regel Coli-Bakterien oder

**Proteus**-Arten, deren Vorkommen in der Natur beinahe als ubiquitär angesehen wird und deren Ansiedelung im menschlichen Organismus bei irgendeiner günstigen Bedingung deshalb gar nicht zu verwundern ist. In anderen, gewiß viel wenigeren Fällen von putriden Infektionen finden wir andere Arten von Bakterien als die pathogenen Keime, die fast ausnahmslos zur Kategorie der obligaten Anaëroben gehören. Leider sind die Studien über diese fäulniserregenden, menschenpathogenen, anaëroben Mikroorganismen mehr oder weniger erschwert, einmal wegen der Schwierigkeiten der Isolierung derselben, ferner wegen ihres schlechten Fortkommens auf den künstlichen Nährsubstraten. Infolgedessen sind unsere Kenntnisse über dieselben noch sehr lückenhaft. Wir möchten im folgenden über 3 Fälle von putriden Infektionen berichten, welche vor allem in bakteriologischer Hinsicht von den bereits publizierten etwas abzuweichen scheinen:

Fall I. U. Furuta, 46-jährige Frau eines Wagenziehers, am 15. Nov 1909 mit der Diagnose Carcinoma mammae in unsere Klinik aufgenommen.

Anamnese: Patientin stammt angeblich aus einer gesunden Familie, litt im Kindesalter an Pocken und im 28. Lebensjahre an einer Augenerkrankung; sonst war sie stets gesund. Sie hat nur einmal geboren und selbst gestillt. Trauma aus der Brust und Mastitis werden in Abrede gestellt. Vor ca. 20 Monaten bekam sie ohne jegliches veranlassende Moment unbedeutende Schmerzen an der rechten Brustwarze. Kurz danach bemerkte sie einen harten, über dem Niveau der umgebenden Hautdecke etwas erhabenen, nicht scharf markierten Tumor in der rechten Mamma, knapp oberhalb der Mamilla, welche ein wenig eingezogen war. Der Tumor hat sich seither allmählich bis zum jetzigen Umfange vergrößert. Seit 5 Monaten nimmt man eine lividrote Verfärbung der Haut über dem Tumor selbst wahr.

Status praesens. Eine kräftig gebaute, gut genährte, nicht anämische Frau. Macula corneae am rechten Auge. Am Halse keine beträchtliche Drüsenanschwellung nachweisbar. Thorax symmetrisch gebaut. Ueber den Lungen überall voller Schall und vesikuläres Atmen, ohne Nebengeräusche. Herz ohne Besonderheiten. Abdomen weder abnorm aufgetrieben noch eingesunken. Leber von normaler Größe und Konsistenz. Uebrige Baucheingeweide ohne abnormen Befund. Wirbelsäule und Extremitäten intakt.

Die linke Brustdrüse erweist sich vollkommen normal. Die rechte Mamilla ist hingegen ziemlich stark eingezogen. Unterhalb derselben zeigt sich die Haut schwärzlich verfärbt und teilweise ulzeriert. Im oberen äußeren Quadranten der rechten Mamma befindet sich eine harte, über gänseeigroße Geschwulst. Die Haut daselbst glänzend, bläulich-rot verfärbt und fest mit dem Tumor verwachsen. Entlang dem unteren Rande des Pectoralis mehrere kleine, derbe Knoten durchföhlbar. In der Achselhölle der betreffenden Seite eine nahezu hühnereigroße, derbe, höckerige Drüsenanschwellung konstaterbar. Supra- und Infraclaviculargruben beiderseits frei.

19. Nov. 1909. Operation in Chloroformnarkose. Amputation der rechten Brustdrüse, mit Ausräumung der Achselhölle. Die Wunde bis auf eine kleine Drainöffnung vernäht. Aseptischer Verband.

20. Nov. 1909. Allgemeinbefinden stark gestört. Nachmittags Körpertemperatur 37,8° C. Puls regelmäßig, etwas schwach gespannt, 128 Schläge in der Minute. Appetitlosigkeit und Uebelkeit.

21. Nov. 1909. Drainage entfernt. Stagnation des Wundsekretes gar nicht zu konstatieren. Allgemeinbefinden noch immer gestört. Anorexie. Nachmittags Körpertemperatur 38,2° C. Puls 128 Schläge in der Minute.

22. Nov. 1909. Nachmittags um 5 Uhr Schüttelfrost mit nachfolgender Temperatursteigerung bis auf 40,0° C. Puls beschleunigt, 140 Schläge in der Minute, schwach gespannt, jedoch regelmäßig. Atmung etwas unruhig. Starke Abgeschlagenheit. Innere Organe, Gelenke etc. ganz in Ordnung. Die zusammengenähten Wundränder mäßig stark gerötet und druckempfindlich. Die Wunde aufgemacht, spritzt ein dünnflüssiges, blutiges, sehr stinkendes Sekret reichlich heraus, dabei entweicht mit leisem Zischen eine geringe Menge von ebenso stark stinkenden Gasblasen aus der Tiefe der Wunde. Die Wundfläche sieht schmutzig dunkelrot aus, ist nirgends sphazeliert. Das Sekret wird jetzt mittels eines sterilen Wattebauschs aus der Tiefe der Wundhölle entnommen zum Zwecke bakteriologischer Untersuchungen. Tamponade derselben mit trockenen sterilen Gazestreifen.

23. Nov. 1909. Allgemeine Zustände etwas gebessert. Nachmittags Körpertemperatur 37,7° C. Puls 124 Schläge in der Minute. Die Granulationsfläche morsch und mißfarbig. Sekret dünnflüssig, bräunlich-rot, trübe und stark stinkend.

24. Nov. 1909. Allgemeine Zustände, wie gestern. Nachmittags Körpertemperatur 38,9° C. Puls 108 Schläge in der Minute. Granulationen schmutzig mißfarbig; Sekret hämorrhagisch-eitrig, reichlich und äußerst stinkend.

26. Nov. 1909. Allgemeine Zustände ziemlich gebessert. Körpertemperatur 39,1° C. Puls 122 Schläge in der Minute. Granulationen noch schmutzig belegt; Sekret stinkend und reichlich.

27. Nov. 1909. Allgemeinbefinden ziemlich wohl. Körpertemperatur 37,6° C. Puls 114 Schläge in der Minute. Wunde etwas gereinigt.

30. Dez. 1909. Wundfläche ganz gereinigt; Sekret erheblich vermindert und nicht stinkend. Allgemeinbefinden sehr wohl. Appetit stark gesteigert. Kein Fieber mehr. Gebessert entlassen.

Durch die mikroskopische Untersuchung des Wundsekrets, welches am 22. Nov. 1909 nach dem Aufmachen der genähten Wunde sofort entnommen wurde, konstatierten wir darin außer einer relativ geringen Anzahl von Eiterkörperchen zahllose Mikroorganismen von verschiedenen Formen und Größen. Darunter ist eine Art von Kokken am zahlreichsten vertreten, welche meistens sich als Diplokokken darbieten und eine Größe von ca. 0,8  $\mu$  Breite und 1,6  $\mu$  Länge besitzen. Sie bilden nicht selten kurze Ketten von 4 bis höchstens 8 Gliedern. Zwar behalten einzelne Kokken gewöhnlich Kugelform bei, doch sind etwas längere oder kürzere Formen nicht selten vorhanden. Es gibt sonst vereinzelte längliche Exemplare mit einer mehr oder weniger unvollständigen Teilungsfurche. Die Mikroorganismen färben sich gut mit gewöhnlichen Anilinfarben und werden gar nicht nach Gram entfarbt.

Außer diesen Diplokokken finden wir noch zwei Arten von Mikroorganismen, welche zwar nicht zahlreich vorhanden, morphologisch jedoch sehr eigentümlich sind. Die eine Art ist bogenförmig, die andere fadenförmig. Die bogenförmigen Bakterien sind durchschnittlich 0,5  $\mu$  dick, 3,6  $\mu$  lang und meistens schwach gekrümmt. Die mittlere Partie des Bakterienleibes ist um eine Idee dicker als die beiden Enden. Die letzteren sind in der Regel abgerundet, zeigen sich ab und zu ziemlich stark verjüngt, aber niemals zugespitzt. Die Bakterien sind zuweilen vereinzelt anzutreffen, gruppieren sich aber sehr oft, besonders Seite zu Seite aneinander und bilden nicht selten ein kleines Konglomerat. Mit den gewöhnlichen Farbstoffen sind sie gut färbbar. Auch die Gramsche Methode ist ziemlich gut anzuwenden, wobei der Leib eine leicht violettrote Nüance erhält. Die fadenförmigen Bakterien sind ausnahmslos vereinzelt vorhanden und besitzen eine Breite von ca. 0,5—0,6  $\mu$ . Die Länge derselben variiert zwischen 3 und 60  $\mu$ . Die kürzeren Fäden sind meist gerade, oder nur leicht gebogen, die längeren dagegen häufig etwas geschlängelt. Sie sind überall beinahe gleichbreit und enden abgerundet. Häufig finden wir jedoch, besonders bei den längeren Individuen, einige verschmälerte Stellen, so daß sie manchmal dadurch vollständig getrennt zu sein scheinen. Sie färben sich gut mit gewöhnlichen Farblösungen. Auch die Gramsche Methode ist ziemlich gut anwendbar, besonders bei den kürzeren Individuen.

Von dem Sekrete werden mehrere Agarplattenkulturen und gleichzeitig hochschichtige Schüttelkulturen in Traubenzuckeragar mit und ohne Ueberschichtung hergestellt. Die Schüttelkulturen zeigen schon nach 24 Stunden bei Bruttemperatur im Nährsubstrate, je nach der Verdünnung der Aussaat, verschieden zahlreiche, kleine, weißliche Pünktchen, besonders üppig in der oberen Schicht. Dabei wird selbst nach mehreren Tagen langem Liegenlassen der Kulturgläser im Thermostaten keine Gasentwicklung konstatiert. Leider gelang es uns nicht, in diesen anaërobiotischen Kulturen außer einer fakultativ anaëroben Bak-



terienart andere im Sekrete mikroskopisch nachgewiesene Mikroben zur Entwicklung zu bringen.

Auf allen Agarplatten kamen nach 24 Stunden bei Bruttemperatur runde, in dünnen Einsaaten ca. 3 mm große, weißliche, oberflächliche Kolonien in Reinkultur zum Vorschein. Alle Kulturen riechen intensiv, und zwar eigentümlich faulig. Mikroskopisch erwiesen sich dieselben ausschließlich als mittelgroße Diplokokken.

Der gezüchtete Mikroorganismus zeigte in gewissen Nährmedien ziemlich zahlreiche Gestaltsveränderungen. Er hat jedoch gewöhnlich eine mehr oder weniger gut ausgebildete Diplokokkenform, indem meistens zwei beinahe kreisrunde Kugeln dicht aneinander liegen. Allerdings ist er je nach den Kultursubstraten ungleich groß; im allgemeinen ist er in flüssigen Kulturen etwas größer, als in festen Nährböden.

Im hängenden Tropfen zeigt der Mikroorganismus keine Eigenbewegung.

Er färbt sich mit gewöhnlichen Anilinfarben sehr gut. Auch die Gramsche Methode ist gut anwendbar; bei älteren Kulturen wird aber eine nicht geringe Anzahl desselben ziemlich schnell entfärbt. Mit der Lugolschen Lösung färbt er sich hellgelb.

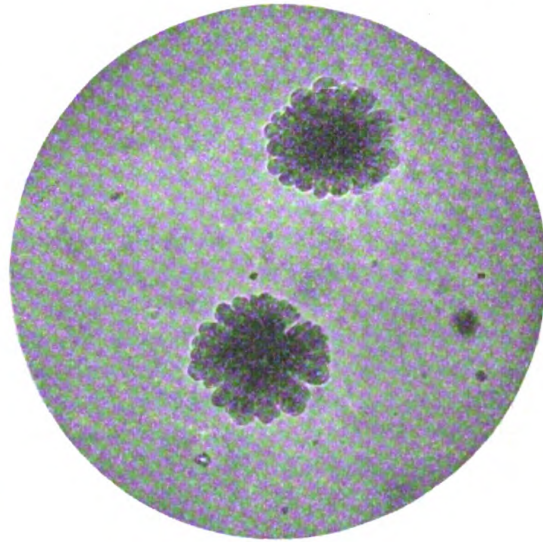
Am Mikroorganismus ist die Kapsel niemals nachweisbar. Ebenso wenig ist Sporenbildung in verschiedenen Nährsubstraten zu konstatieren.

In jüngeren Agarkulturen findet man meistens regelmäßig gestaltete Diplokokken, deren einzelner Coccus  $0,7 \mu$  groß ist.

Freilich ist die Größe zuweilen ungleich. Dazu ist der Mikroorganismus nicht selten, je nach den verschiedenen Entwicklungsstadien, bald senkrecht zur Achse des Kokkenpaares, bald parallel mit derselben ein wenig abgeplattet, wie es bei den Streptokokken in der Regel der Fall ist. Außer den Diplokokken gibt es noch sehr häufig vereinzelte Monokokken und auch unvollständig geteilte Bisquitformen, welche letztere mehr oder weniger deutlich eine Einschnürung in der Mitte erkennen lassen. Seltenerweise sind längere Bacillenformen sichtbar. Selbst in älteren Kulturen sind die Bakterien in der Regel ebenso regelmäßig gestaltet, wie in jüngeren, und etwaige abweichende Formen, wie kürzere oder längere Bacillen etc., sind seltene Ausnahmen; nur ist die Größe derselben zuweilen etwas ungleich.

In gewöhnlicher Fleischpeptonbouillon ist der Mikroorganismus  $0,8 - 1,0 \mu$  groß und als ein Diplococcus  $1,6 - 2,0 \mu$  lang. Er ist meistens gleichgroß, regelmäßig gestaltet und bildet gewöhnlich Diplokokken. Nicht selten findet man auch runde oder ein wenig ovale Monokokken. Außerdem sind zuweilen bacillenförmige und lange fadenartige Gebilde zu sehen.

Bei den Kartoffelkulturen stellt der Mikroorganismus ebenfalls Diplokokken dar, welche meistens  $0,8 \mu$  breit sind. Zuweilen findet



man ganz kurze Diplobacillen; eine längere Bacillenform fehlt hier fast ganz.

Außer diesen eben genannten Formen lassen sich in gewissen Nährsubstraten nicht selten mannigfaltige, zuweilen sehr abweichende Gestalten wahrnehmen, namentlich auf 3-proz. Salzagar, 5-proz. Glyzerinagar, in sterilisiertem Harn, in der vereinfachten U sch i n s k y schen Lösung nach C. Fränkel und in 6-proz. Glyzerinbouillon. Besonders eigentümliche Formveränderungen sind in der letztgenannten Glyzerinbouillon schon nach 18 Stunden bei Bruttemperatur nachzuweisen. In dieser Flüssigkeit treten die typischen Diplokokken ganz in den Hintergrund, indem die meisten Individuen teils in kurze und mittellange Stäbchen mit der durchschnittlichen Breite  $0,8\ \mu$ , teils in sehr lange Fäden umgewandelt sind. Die Fäden sind selten gerade, meistens mehrfach gewunden oder geschlängelt, manchmal spiralig gedreht und bilden zuweilen einen lockeren Knäuel. Die Dicke derselben ist bald überall gleichmäßig, bald sehr schwankend, etwa zwischen  $0,3$  und  $1,5\ \mu$ . Sie sind manchmal ungleich segmentiert und häufig an einigen Stellen spindelförmig aufgebläht. Die Dicke dieser spindelförmig angeschwollenen Teile beträgt von  $1,5$  bis  $3,0\ \mu$ . Außerdem sind spindelbacillusähnliche Gebilde von riesigen Dimensionen, Fäden mit keulenförmig verdickten Enden, Torula-Formen etc. gar nicht seltene Befunde. Mit gewöhnlichen Anilinfarben färben sich die Bacillen und Fäden gut. Zuweilen nimmt man an mehreren Stellen der in der Regel ungleichmäßig und etwas schwächer als sonst gefärbten Fäden ungefärbte, vakuolenartige Gebilde wahr. Fast alle Exemplare in der Glyzerinbouillon werden, im Gegensatz zu den Diplokokken in anderen Kulturen, nach Gram relativ schnell entfärbt, nur behalten die spindelförmig aufgeblähten Stellen zuweilen noch eine mehr oder weniger deutlich violette Farbe bei. Ein ähnliches Bild ist, wenn auch weit weniger ausgeprägt, bei den Kulturen in der vereinfachten U sch i n s k y schen Lösung und im Harn zu beobachten, wo der Mikroorganismus neben anderen zuweilen eine lange Streptokokkenform annimmt.

Der Mikroorganismus wächst auf verschiedenen Nährböden sehr schnell und üppig. Das Wachstum geschieht sowohl bei Bruttemperatur, als auch bei Zimmertemperatur, bei der letzteren jedoch viel langsamer. Zwar gehört er zu den fakultativ anaëroben Bakterien, doch wächst er unter strengem Luftabschluß recht kümmerlich. In der  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre kommt er ebensowenig fort. Eine ganz schwach alkalische Reaktion der Nährmedien eignet sich zu seinem Wachstum sehr gut. Uebrigens scheint durch den Zusatz von Zuckerarten, wie Traubenzucker, Milchezucker, Rohrzucker, Maltose, Lävulose und auch von Dextrin das Wachstum ziemlich begünstigt zu werden.

Auf 15-proz. Gelatineplatten entstehen nach 5—7 Tagen bei  $16$  bis  $18^\circ\text{C}$  durchschnittlich  $2\text{ mm}$  große, aufliegende Kolonien und kleine, tiefliegende Pünktchen. Die ersteren sind etwas halbkugelig erhaben, weißlich, feuchtglänzend, meistens nur wenig oder fast gar nicht durchscheinend und von rahmiger, etwas fadenziehender Konsistenz. Die Gelatine wird dabei nicht verflüssigt. Bei schwacher Vergrößerung erweist sich die Randzone hell durchscheinend und fein granuliert; daselbst sind häufig feine, radiäre Streifen sichtbar. Sonstige Teile, insbesondere das Zentrum, sind dunkler gefärbt, zuweilen mit gröberen Körnern besetzt und häufig mit einigen konzentrischen Kreislinien versehen. Die Ränder sind scharf konturiert und fast immer beinahe glatt, selten etwas uneben.



Die letzteren sind rund, glattrandig, feinkörnig und etwas blaßbräunlich durchscheinend. Die Randzone ist hell, während die zentrale Partie gewöhnlich etwas dunkler aussieht und in sich einige konzentrische Ringe wahrnehmen läßt.

In den Gelatinekulturen, bei 20—22° C gezüchtet, ist das Wachstum des Mikroorganismus sehr eigentümlich. Nach 3—4 Tagen kommen nämlich 2—3 mm große oberflächliche Kolonien zum Vorschein. Diese sind etwas halbkugelig erhaben, weißlich, an der Peripherie ein wenig durchscheinend und am Zentrum dunkler aussehend. Bei schwacher Vergrößerung sind sie hellbräunlich und fein granuliert. Die Ränder sind uneben und häufig mit vielen, teils tieferen, teils seichteren Einkerbungen versehen, neben feinen radiären Streifen und Furchen. Im Zentrum befinden sich manchmal Ursprungskerne, welche wie tiefliegende Kolonien gestaltet sind.

Die tiefliegenden Kolonien sind punktförmig, weißlich und kaum  $\frac{1}{2}$  mm groß. Bei schwacher Vergrößerung sieht man, daß sie aus vielen keulenförmigen und lappenartigen Gebilden bestehen, welche von einem bräunlich-gelb aussehenden Zentrum aus nach allen Seiten hinausgehen. Sie nehmen deshalb etwa eine an *Actinomyces*-Drusen oder *Chrysanthemum*-Blumen erinnernde Gestalt an (s. die nebenstehende Figur!). Jeder Lappen ist hellgelblich durchscheinend, fein granuliert und hat beinahe gleiche Länge, so daß die ganze Kolonie eine runde Form annimmt. Die Breite derselben ist hingegen ungleich. Die Zahl der Lappen ist höchstwahrscheinlich je nach der Konsistenz von Nährmedien verschieden, indem sie bald 40—50, bald über 100 beträgt.

Die Gelatinestrichkulturen zeigen nach 4 Tagen bei 18° C einen ca. 3 mm breiten, etwas erhabenen, weißlichen, saftig glänzenden und ein wenig durchscheinenden Belag. Die Ränder desselben sind fein eingekerbt.

In den Gelatinestichkulturen wächst der Mikroorganismus nach 6 Tagen bei Zimmertemperatur entlang dem Stichkanale dünn fadenförmig. Auf der Oberfläche der Gelatine bildet sich eine runde, 2—3 mm große, zuweilen stark erhabene, weißliche und feuchtglänzende Auflagerung. Das Nährsubstrat wird dabei nicht verflüssigt; dasselbe fluoreziert niemals.

Auf den Agarplatten erhält man schon nach 18 Stunden bei 37° C ein üppiges Wachstum der Bakterien. Die oberflächlichen Kolonien sind etwas halbkugelig erhaben, 2—3 mm groß, weißlich, saftig glänzend, rahmig und etwas fadenziehend. Bei schwacher Vergrößerung sehen sie blaßbräunlich, fein körnig aus und scheinen nicht durch. Die Ränder sind in der Regel nicht ganz glatt, hingegen häufig mit mehreren, meist seichten Einkerbungen besetzt. Weder radiäre Streifen noch konzentrische Ringe sind daran zu konstatieren. Die tiefliegenden Kolonien sind ganz klein, kaum  $\frac{1}{3}$  mm groß. Bei schwacher Vergrößerung sind sie meist rund oder elliptisch, zuweilen wetzsteinförmig, bräunlich-gelb, fein granuliert und nur wenig durchscheinend. Die Randzone scheint etwas hell durch.

Die Agarstrichkulturen zeigen nach 24 Stunden bei Bruttemperatur ein üppiges Wachstum. Die Auflagerung ist ca. 4 mm breit, weißlich, mäßig erhaben, feuchtglänzend, nicht durchscheinend und von rahmiger, etwas fadenziehender Konsistenz. Die Ränder sind beinahe glatt oder fein eingekerbt. Das Kondenswasser ist stark getrübt und enthält in sich eine mäßige Menge von weißem Bodensatz.



Auch auf dem Glyzerinagar findet bei Bruttemperatur ein ziemlich üppiges Wachstum statt; allerdings ist der Belag hier ein wenig dünner als der auf dem gewöhnlichen Nähragar, und gleichzeitig scheint derselbe mehr durch.

In den Agarstichkulturen erfolgt das Wachstum nach 24 Stunden bei 37° C um die Einstichöffnung und längs des Stiches. Die Auflagerung ist anfangs flach erhaben, rundlich, feuchtglänzend und verbreitet sich bald nachher über die ganze Fläche des Agars. Das Wachstum an der Stichlinie ist dünn fadenförmig, ohne seitliche Verzweigungen und in der unteren Strecke recht kümmerlich.

Die bei 37° C gezüchteten Bouillonkulturen bieten schon nach 18 Stunden eine ziemlich starke, diffuse Trübung dar. Der weißlich-schleimige Bodensatz ist anfangs gering, wird später aber mäßig viel. Beim Schütteln zerteilt er sich zu einer diffusen Trübung. Nur selten ist eine ganz minimale Kahmhautbildung zu bemerken.

Die Kulturen im Peptonwasser zeigen nach 24 Stunden bei 37° C eine mäßig starke, diffuse Trübung. Bodensatz, welcher anfangs kaum existiert, wird erst später ein wenig gebildet.

Auf Kartoffeln findet eine sehr üppige Entwicklung des Mikroorganismus statt, welche sich nach 24 Stunden bei 37° C als ein weißlicher oder gelblichweißer, ca. 4 mm breiter, ziemlich stark erhabener, mattglänzender Belag erkennen läßt. Später wird der Belag etwas breiter und glänzend. Die Konsistenz desselben ist ziemlich zähe.

Die mit dem Bakterienmaterial geimpfte Milch wird bei 37° C regelmäßig nach 4 Tagen vollständig und ganz fest koaguliert.

Auf dem schräg erstarrten Rinderserum ist nach 24 Stunden bei 37° C ein ziemlich üppiges Wachstum von ca. 1/2 cm breitem Belag zu konstatieren. Derselbe ist weißlich, etwas erhaben, feuchtglänzend und rahmig. Das Kondenswasser ist trübe, und enthält eine mäßige Menge weißlichen Bodensatzes. Das Nährsubstrat wird während einer mehrtägigen Beobachtungszeit gar nicht verflüssigt.

Der Mikroorganismus verbreitet in allen Nährsubstraten einen eigentümlich stinkenden Geruch, besonders intensiv in Agar-, Gelatine- und Bouillonkulturen.

Schwefelwasserstoffentwicklung wird niemals beobachtet.

Im Peptonwasser wird zuweilen, aber durchaus nicht immer, erst nach 5 Tagen bei 37° C eine Spur von Indol nachgewiesen, welche sich später nicht deutlich vermehrt.

In den Nährböden mit verschiedenen Zuckerarten ist keine Gasbildung zu konstatieren. In den Nährmedien, welche Laktose, Maltose, Rohrzucker, Stärke, Dextrin, Glyzerin, Mannit etc. enthalten, tritt keine Säurebildung auf. Nur in den Traubenzucker und Lävulose enthaltenden Substraten ist einige Male bei jüngeren Kulturen eine geringfügige Rötung der Lackmusfarbe bemerkt worden.

Sehr auffallend ist das Reduktionsvermögen des Mikroorganismus. Die Lackmusbouillonkulturen mit verschiedenen Zuckerarten werden nach 24 Stunden größtenteils und nach weiteren 24 Stunden vollständig entfärbt. Ähnliches geschieht auch in den Lackmuszuckeragarkulturen.

Auf mit Menschenblut bestrichenen Agarflächen, sowie in den Blutagarplatten findet keine hämolytische Erscheinung statt.

Die Resistenz des Mikroorganismus ist keine sehr starke. Die auf der Glasfläche dünn ausgestrichenen und an eine dunkle, kühle Stelle gestellten Mikroben verlieren innerhalb 2 Wochen ihre Auskeimfähigkeit.

Dagegen kann aus den 24 Stunden lang im Brutofen gehaltenen, nachher an einer kühlen Stelle aufbewahrten Agarstrichkulturen noch nach 60 Tagen mit Erfolg überimpft werden. Durch die feuchte Hitze von 56° C werden die Keime in 20 Minuten noch nicht, sondern erst nach 25 Minuten sicher abgetötet. Auch gegen Chemikalien ist die Resistenz des Mikroorganismus gering. In 1-prom. Sublimatlösung wird derselbe innerhalb einer halben Minute, in 1-proz. Lysollösung in 1—2 Minuten und in 3-proz. Karbollösung nach 1 Minute vollständig vernichtet; in 85-proz. Alkohol bleibt derselbe nach 5 Minuten noch lebensfähig. Die auf der Agaroberfläche ausgestrichenen Keime haben sich im Monate Dezember nach einer 2½-stündigen Bestrahlung mit direktem Sonnenlicht nicht mehr als entwicklungsfähig erwiesen.

Der Mikroorganismus ist für Mäuse sehr stark und für Meerschweinchen mäßig stark pathogen. Mäuse gehen durch die subkutane Einverleibung von 0,1 Oese einer 5-tägigen Agarstrichkultur schon nach 12 Stunden zugrunde. Die Sektion ergibt in der Injektionsstelle nichts Abnormes, oder zuweilen ein leicht ödematöses Aussehen des subkutanen Gewebes. In den Lungen sind meistens beträchtliche hämorrhagische Herde nachweisbar. Impfungen des Herzblutes auf die Agarplatten fallen ausnahmslos positiv aus. Einmal wurde bei intraperitonealer Einverleibung einer relativ großen Dose ( $\frac{3}{10}$  Oese) schon nach 6 Stunden der Tod des Tieres beobachtet. Die Sektion hat in den inneren Organen nichts Abnormes konstatiert; bloß im Herzblute wurden Diplokokken reichlich gefunden. Die subkutane Injektion ruft bei Meerschweinchen nur eine vorübergehende Rötung, selten eine lokale Abszeßbildung hervor. Die intraperitoneale Injektion von 1 ccm einer 3-tägigen Bouillonkultur bewirkt hingegen den Exitus der Tiere nach 10 Stunden. Die Obduktion weist in der Abdominalhöhle eine geringe Menge blutiger Flüssigkeit und mehrere hämorrhagische Herde unter der Darmserosa nach. Aus dem Herzblute kommen auf Agarplatten zahlreiche Kolonien von Diplokokken zur Entwicklung.

Für Kaninchen ist der Mikroorganismus weniger pathogen. So können einem Tiere 2 Oesen von virulenten Keimen ruhig unter die Rückenhaut injiziert werden, die von einer an peritonealer Infektion gestorbenen Maus isoliert sind, ohne daß irgendwelche Schädigung des Tieres infolgedessen auftritt. Selbst die subkutane Einverleibung des ganzen Belags einer Agarstrichkultur ist bei Kaninchen ganz erfolglos. Nur einmal ist eine kleine erbsengroße Abszeßbildung mit zähem, gelblichweißem Eiter im Ohrappen eines Tieres nach der Einspritzung von 1 ccm einer 5-tägigen Bouillonkultur beobachtet worden, und im Eiter wurden sowohl mikroskopisch als kulturell typische Diplokokken reichlich konstatiert.

Die 9 Monate später mit den Bakterien von der 15. bis 17. Generation vorgenommenen Tierversuche sind fast immer negativ gewesen, indem der Mikroorganismus zum größten Teil seine frühere Pathogenität für Mäuse und Meerschweinchen eingebüßt hat. Zwar gehen Mäuse bei der intraperitonealen Einverleibung einer ziemlich großen Dose, etwa über 2 Oesen, binnen 24 Stunden zugrunde, doch findet man bei der Untersuchung des Herzblutes und Peritonealsaftes die Mikroben nicht. Die Tiere sterben auch zuweilen bei der subkutanen Injektion einer mäßig großen Dose der Bouillonkultur innerhalb 24 Stunden; die Obduktion zeigt jedoch nur hämorrhagische Herde in den Lungen, und das Herzblut erweist sich als ganz steril. Bei der subkutanen Injektion in

ein Meerschweinchen zeigt sich nur eine leichte, vorübergehende Rötung an der Injektionsstelle. Für Kaninchen ist überhaupt die pathogene Wirkung der Keime nicht mehr nachzuweisen.

Wenn wir nun die Merkmale des oben erwähnten Mikroorganismus rekapitulieren, so stellt derselbe sowohl im Eiter als in den gewöhnlichen Nährböden einen grambeständigen, mittelgroßen *Diplococcus* dar. Er zeichnet sich dadurch aus, daß er in allen Kulturen einen fauligen Geruch verbreitet, für Mäuse exquisit pathogen ist und in gewissen Nährböden einige teratologische Wuchsformen bildet.

Wir sind nicht imstande, in der uns zugänglichen Literatur eine Bakterienart aufzufinden, welche mit unserem Mikroorganismus zu identifizieren ist. Er hat jedoch mit dem *Bacillus* eine sehr große Ähnlichkeit, den Waelsch 1905 im Präputialsekret nicht venerisch kranker Individuen gefunden, und wegen seiner Neigung, eigenartige Involutionsformen zu bilden, als *Bacillus involutus* bezeichnet hat. Dieser *Bacillus involutus* ist ein fakultativer Anaërobe, grampositiv und zeigt in fast allen Nährböden ungemein verschiedene Formen, wie plumpe Stäbchen, lange, gegliederte und ungegliederte Stäbchen, kolbig verdickte Bacillen, Mono- und Diplokokken, Kettenkokken, perlschnurartig aneinander gereimte Gebilde etc. Er bildet in Gelatineplatten Kolonien in Form von schönen, blütenförmigen Rosetten, ohne dabei das Substrat zu verflüssigen. Die Kolonien auf Agar, Traubenzucker etc. sind weißlich, erhaben, feuchtglänzend und von fadenziehender Konsistenz. Er vergärt Traubenzucker nicht. Bouillon wird erst nach 5 Tagen deutlich getrübt und Milch gar nicht koaguliert; auf Kartoffeln erfolgt ein sehr langsames, spärliches Wachstum in Form eines dünnen, vom Nährboden schwer unterscheidbaren Ueberzuges. Bezüglich des Gestanks der Kulturen wird aber nichts angegeben. Außerdem erweist sich der Mikroorganismus für Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten und weiße Mäuse als nicht pathogen.

Unser Mikroorganismus stellt dagegen sowohl im Eiter und Tierkörper als auch in allen gewöhnlichen Nährböden in der Regel mehr oder weniger gut ausgebildete Diplokokken dar, und nur in denjenigen Substraten, welche wahrscheinlich für sein Fortkommen nicht ganz indifferent sind, scheint er neben der Kokkenform auch einige abweichende Degenerationsformen zu bilden. Abgesehen von der 60-proz. Glycerinbouillonkultur, überwiegen in den gewöhnlichen Nährböden Diplo- und Monokokken in der Regel, selbst in denjenigen Fällen, wo mannigfaltige abweichende Formen daneben nachzuweisen sind. Deshalb muß unseres Erachtens die Grundform unseres Mikroorganismus nicht ein *Bacillus*, sondern ein *Diplococcus* sein. Ferner unterscheidet er sich noch dadurch von dem Waelsch'schen *Bacillus*, daß er in der Bouillon innerhalb kurzer Zeit eine starke Trübung der Flüssigkeit verursacht, die Milch binnen 4 Tagen zur festen Gerinnung bringt, auf Kartoffeln schnell üppiges Wachstum von einem ziemlich stark erhabenen, weißlichen, zähen Belag erkennen läßt und für Mäuse sehr pathogen ist. So möchten wir unseren Mikroorganismus wegen seiner Eigenschaft, in fast allen Kulturen einen eigentümlich fauligen Geruch zu verbreiten, neben dem starken Sauerstoffbedürfnisse als ***Diplococcus foetidus aërobius*** bezeichnen.

Immerhin ist unser Mikroorganismus mit dem von Waelsch bis auf das Verhalten in Milch und auf Kartoffeln und bis auf die Tierpathogenität übereinstimmend; beide sind miteinander wohl sehr nahe verwandt.

Der zweite Fall betrifft einen 32-jährigen Bauer, T. Yoshioka, der wegen rechtsseitigem Empyema perforans am 11. März 1909 in unserer Klinik thorakotomiert wurde. Das Wundsekret war ziemlich reichlich, schmierig-eitrig und verbreitete einen süßlich-widerlichen Geruch. Auf den mit dem Eiter beschickten Agarplatten kam aërob nur eine Bakterienart zur Entwicklung. Der gezüchtete Mikroorganismus erwies sich als mittelgroßer *Diplococcus*; daneben waren verschiedene Entwicklungsformen von runden Monokokken bis zu länglichen, in der Mitte eingeschnürten oder unvollkommen durchgetrennten Individuen zu finden. Auf der Agarfläche wurden nur ausnahmsweise und erst später längere Bacillen- oder Fadenformen beobachtet. Der Mikroorganismus war grambeständig und zeigte keine Eigenbewegung. In verschiedenen Kulturen verhielt er sich dem obengenannten Mikroorganismus fast vollständig gleich, und alle Kulturen rochen intensiv faulig. Nur trat die Gerinnung der Milch ein wenig später ein.

Im dritten Falle handelte es sich um linksseitige Coxitis eines 35-jährigen Bauers, G. Hayashi. Er wurde am 17. April 1909 in unserer Klinik reseziert. Danach wurde das Sekret ziemlich reichlich und mäßig stark stinkend. Vom Eiter wurde ein *Diplococcus* isoliert, den wir mittels verschiedener Kulturproben mit dem bereits erwähnten Mikroorganismus des ersten und zweiten Falles ohne weiteres identifizieren konnten. Freilich war die Neigung desselben, in Kulturen Involutionsformen zu bilden, nur wenig ausgeprägt, wenn wir auch ansehnliche Stäbchen- und Fadenformen in einer alten 6-proz. Glycerinbouillon fanden. Dazu wurde die Milch nach 8 Tagen nur zu teilweiser und erst später zu vollständiger Gerinnung gebracht.

Diese drei Stämme von *Diplococcus* haben das gemeinsam, daß sie in stinkendem Eiter gefunden wurden und in Kulturen einen eigentümlich fauligen Gestank verbreiten. An ihrer Pathogenität für die Menschen zweifeln wir kaum. Ihr Vorkommen in der Natur resp. im stinkenden Eiter scheint nicht allzu selten zu sein, da wir sie innerhalb einer verhältnismäßig kurzen Frist dreimal antreffen konnten.

### Schlußbetrachtung.

Wir konnten dreimal im stinkenden Eiter einen aërob wachsenden, in fast allen Kulturen einen eigentümlich fauligen Geruch verbreitenden, in den Gelatineplatten blütenförmige Rosetten bildenden *Diplococcus* auffinden. Seinem kulturellen Verhalten nach ist er mit dem von Waelsch beschriebenen *Bacillus involutus* sehr nahe verwandt. Wir möchten den Mikroorganismus als *Diplococcus foetidus aërobius* bezeichnen. Soweit wir die uns zugängliche Literatur überblicken konnten, ist ein derartiges Bakterium, wenigstens im stinkenden Eiter, noch nicht beobachtet.

### Literatur.

Waelsch, Ludwig, Ueber einen eigenartigen Mikroorganismus im Präputialsekret (*Bacillus involutus*). (Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Orig. Bd. 36. 1905. p. 645.)

*Nachdruck verboten.*

## Ein Beitrag zur Bakterienflora des Darmes gesunder, erwachsener Rinder, mit besonderer Berücksichtigung der Paratyphus-B-ähnlichen Bakterien.

[Aus dem Veterinärinstitut der Universität Leipzig (Prof. Dr. A. Eber) und dem Laboratorium des städt. Schlachthofes in Leipzig (Vet.-Rat Hengst.)]

Von  
**Dr. A. Horn,**                      und                      **Dr. E. Huber,**  
 ehem. Leiter des bakt. Laboratoriums      ehem. Assistenten des Veterinärinstitutes  
 am städt. Schlachthof in Leipzig.                      in Leipzig.

Die bakteriologischen Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß innerhalb der großen Coli-Typhusgruppe Bakterien vorkommen, die hinsichtlich der Aetiologie vieler Fleischvergiftungen bedeutungsvoll sind. Es sind dies vor allem die beiden Typen der Enteritisbakterien, *Bact. paratyphi B* und *Bact. enteritidis* Gärtner.

Außer beim Paratyphus und gewissen Fleischvergiftungen des Menschen hat man diese Keime auch bei manchen Tierkrankheiten als Erreger gefunden [Uhlenhuth, Hübner, Xylander und Bohtz (67, 68), Glässer (20), Titze und Weichel (63), Schmitt (55), Langkau (38), Ledschbor (39), Joest (28) u. a.<sup>1)</sup>]. Bei der universellen Rolle, die diese Typhaceen demnach als Krankheitserreger bei Mensch und Tieren spielen, lag es nahe, eine Verbreitung derselben auch in der Außenwelt anzunehmen. Fast alle in der letzten Zeit diese Frage behandelnden Arbeiten scheinen in der Tat diese Annahme zu bestätigen und für die Ubiquität zum wenigsten der Paratyphus-B-Keime zu sprechen. In erster Linie wurden Nahrungsmittel und mit solchen in Berührung gelangende Medien auf das Vorkommen von Enteritisbakterien untersucht. Uhlenhuth und Hübner (66) fanden in 100 Wurstproben 6mal Bakterien, die sich von *Bact. paratyphi B* nicht trennen ließen; ähnliche Beobachtungen machten Buthmann (7) und Komma (33) ebenfalls an Wurstproben. Auch Rommler (53) konnte in Fleischwaren und Würsten Paratyphus-B-Bacillen feststellen. Gaethgens (18) fand Bakterien der Hochcholera-Gruppe im Wasser, Rommler und Conradi (52, 9) wiesen sie in Natureis und im Transporteis von Seefischen nach. Die Befunde von Mühlens, Dahm und Fürst (42), die durch Fütterungsversuche an Mäusen anscheinend in einwandfreien Fleischwaren Enteritisbakterien in großer Zahl gefunden hatten, sind durch nachprüfende Untersuchungen von Zwick und Weichel (70) nicht bestätigt worden. Auffallenderweise entdeckte Conradi (10) außer bei zwei Schweinen auch im Muskelfleisch eines gesunden Rindes Schweinepestbakterien. Schließlich sei noch eine Beobachtung Kleins (31) angeführt, der in der Milch von 10 verschiedenen Farmen in 25,5 Proz. *Bact. enteritidis* Gärtner vorfand.

Für die Epidemiologie mancher noch dunkeln Erkrankungen besonders wichtig ist zweifellos die Existenz von Bakterien der großen Enteritisgruppe im Darminhalt gesunder Menschen und Tiere. Nachdem schon ältere Beobachter, vor allem Morgan (41), auf das Vorkommen von Enteritisbakterien im Darme verschiedener Tiere hingewiesen hatten, wurden durch die umfassenden Untersuchungen des Kaiserlichen Gesundheitsamtes zahlreiche Autoren angeregt, sich mit dieser Frage zu beschäftigen. Uhlenhuth, Hübner, Xylander und Bohtz (67, 68) fanden bei 600 gesunden Schweinen und bei einmaliger Untersuchung 51mal, also in etwa 8,4 Proz. der Fälle, Schweinepestbakterien im Darme. Grabert (21) und Seiffert (58) haben ebenfalls Bakterien der Hochcholera-Gruppe im Darme gesunder Schweine nachgewiesen, ersterer sogar zu einem weit höheren Prozentsatz als Uhlenhuth. Schmidt und sein Mitarbeiter (54) fanden bei 700 Schweinen in 4 Proz. der Fälle kulturell mit den Paratyphuskeimen übereinstimmende Bakterien, von denen jedoch nur ca. 1 Proz. und zu meist nur niedrig agglutiniert wurde. Die von Andrejew (2) im Darminhalt von Schafen nachgewiesenen Bakterien werden von diesem Autor trotz Indolbildung und

1) Vor einiger Zeit konnten im Veterinärinstitut der Universität Leipzig Paratyphus-B-Bacillen als Erreger einer ausgebreiteten Kanarienvogelseuche festgestellt werden.

niedriger Agglutination der Hogcholera-Gruppe zugerechnet, während Huber (25) seine den Andrejewschen Hammelkeimen anscheinend nahestehenden Pferdeestämme von der Paratyphus-B-Gruppe abtrennt und als Paracoli-Bakterien bezeichnet. Erwähnt sei noch, daß auch Titze und Weichel (63) aus dem Kote eines Pferdes ein mit *Bact. paratyphi* B übereinstimmendes Bakterium isolierten, und daß Rimpau (49) bei gesunden Menschen 11mal Paratyphuskeime festgestellt hatte.

Da einerseits Bakterien der Enteritis-Gruppe für die Aetiologie der sogenannten Fleischvergiftungen, wie bereits oben erwähnt, von großer Wichtigkeit sind und andererseits hauptsächlich das Fleisch von Wiederkäuern, namentlich weiblicher Rinder, zu Gesundheitsstörungen geführt hat, so muß gerade die Kenntnis der Darmbakterien dieser Tiere als besonders wichtig angesehen werden. Denn es ist nicht von der Hand zu weisen, daß Bakterien der Enteritis-Gruppe, falls sie normalerweise im Darme vorkommen, unter geeigneten Bedingungen in die Organe bzw. in die Muskulatur überwandern oder dorthin verschleppt werden können. Erfahrungsgemäß führt meist der Genuß des Fleisches von notgeschlachteten, also krank gewesenen Tieren zu Gesundheitsstörungen. Bei den die Fleischvergiftungen verschuldenden Schlachttieren liegen also zumeist Verhältnisse vor, die die Schutzkräfte des Körpers gegen eine Invasion gefährlicher Darmbewohner schwächen. Ficker (16, 17) beobachtete bei verschiedenen Versuchstieren schon bei Erschöpfung bzw. durch Hungern ein Einwandern von Bakterien aus dem Darmkanal, und bei Mäusen scheint schon eine einseitige Fleischnahrung zu genügen, um Enteritisbakterien vom Darm in das Blut und damit auch in Organe und Muskulatur übertreten zu lassen [Zwick und Weichel (70)]. Die makroskopisch intakte Schleimhaut der Darmwandungen bilden nach Selter (59) kein unüberwindliches Hindernis für die Darmbakterien. Selbst mit der Darmschleimhaut zufälligerweise in Berührung geratene, für dieselbe unschädliche Bakterienarten können resorbiert und in die Mesenterialdrüsen übergeführt werden [Rogozinski (51)]. Außerdem hat aber Nötzel (44) darauf aufmerksam gemacht, daß die zahlreichen Anastomosen zwischen den Lymphgefäßen und insbesondere zwischen den Vasa afferentia und efferentia der Lymphdrüsen eine völlige Umgehung des bakterienfeindlichen adenoiden Gewebes ermöglichen. Eine gewisse Bestätigung findet die Annahme einer solchen Umgehung der Mesenteriallymphknoten durch die Arbeiten von Conradi (10), Horn (24) u. a., die durch Anreicherung auch im Innern völlig frischer Muskelstücke gesunder Schlachttiere Bakterien nachweisen konnten.

Ueber die Bakterien des Darmkanals des gesunden Rindes existieren zwar eine ganze Anzahl Arbeiten, die sich mit den Darmbakterien im allgemeinen befassen, die Vertreter der Enteritis-Gruppe aber mehr oder weniger unberücksichtigt lassen. Durch die Untersuchungen Neubauers (43) hat es sich herausgestellt, daß die strengen Anaerobier im Rinderdarm über alles Erwarten gering an Zahl sind. Mit den aeroben Bakterien des Rinderdarmes beschäftigte sich Hüttemann (27). Bei 72 Rindern konnte er in den verschiedenen Darmabschnitten 19 bekannte und 6 unbekannte Mikroorganismen isolieren. Stets vorhanden waren *Bac. subtilis* und *Bact. coli* sowie verschiedene Abarten des letzteren. Neben *Bact. faecalis alcaligenes* fand Hüttemann nicht indolbildende, zum Teil auch Traubenzucker nicht vergärende Coli-Bakterien. *Bact. paratyphi* B oder Paratyphus-B-ähnliche Bakterien sind von Hüttemann nicht beschrieben worden, desgleichen fehlen auch Angaben über die Verteilung der verschiedenen Bakterien und über die Größe der Keimzahl in den einzelnen Darmabschnitten. Diese Lücke ist bis zu einem gewissen Grade durch die Untersuchungen Ankersmits (2) ausgefüllt. Er fand die höchsten Keimzahlen beim Rinde stets im Pansen, während im Labmagen eine bedeutende Reduktion eintrat, die im mittleren Dünndarme sogar noch erheblicher wurde. Im Dickdarm, besonders im Blinddarm und Mastdarm war wieder ein Ansteigen des Keimgehaltes zu verzeichnen, das nicht nur auf die Eindickung des Darminhaltes, sondern auch auf eine Vermehrung der Bakterien zurückzuführen war. Allerdings wurden die hohen Keimzahlen des Pansens nicht wieder erreicht. Neben den obligaten Darmbakterien, *Bact. Güntheri* und *Bact. coli*, deren Hauptbrutstätte im Pansen bzw. im Dün- und Dickdarm war, konnte Ankersmit als fakultative Darmbewohner Kokken, Erdbakterien, Fäulnisbakterien, Cellulose- und Hemicellulosevergärer feststellen. Bakterien der Hogcholera-Gruppe sind auch von Ankersmit nicht erwähnt worden.

Morgan (41) hat wohl als erster wie bei anderen Tieren so auch beim Rinde Enteritisbakterien im Darme festgestellt. Bei Ochsen fand er 4mal Bakterien der Enteritis-Gruppe im Dickdarm, beim Kalbe je einmal im Dünndarm und Dickdarm. Zweimal traf er *Bact. paratyphi* A im Kälberdarm an. Aus dem uns vorliegenden Referat der Morganschen Arbeit ist nicht zu ersehen, ob die von Morgan gefundenen Keime dem Typus I (*Bact. paratyphi* B) oder dem Typus II (*Bact. enteritidis* Gärtner) der Enteritisbakterien angehörten. Auch Eckert (13) berichtet, daß er bei einem von 16 Rindern *Bact. paratyphi* B im Darminhalt nachgewiesen



habe. Zu sehr interessanten und wichtigen Resultaten führten die Untersuchungen von Titze und Weichel (63). Um festzustellen, welche Rolle die Fleischvergifter für die Aetiologie der Kälberruhr spielen, haben die beiden Autoren zunächst 200 Kälberruhrstämme untersucht und dabei 28 Paracoli-Stämme gefunden, von denen sich 23 weder kulturell noch durch Agglutination vom *Bact. enteritidis* Gärtner, und 1 Stamm nicht vom *Bac. suipestifer* unterscheiden ließen. Außerdem wurden 4 Stämme gefunden, die sich kulturell wie *Bac. suipestifer*, *Bact. paratyphi* B und *Bact. enteritidis* Gärtner verhielten, die aber von keinem dieser Sera agglutiniert wurden. Um nun Anhaltspunkte zu bekommen, inwieweit diese Bakterienformen im Darne von gesunden Tieren vorkommen, untersuchten Titze und Weichel den Kot von 44 erwachsenen Rindern aus verschiedenen Beständen, fanden jedoch in keinem Falle derartige Bakterien, sondern im allgemeinen nur Coli-Bakterien, Heubacillen und vereinzelt *Bact. faecalis alcaligenes*. Das gleiche Resultat erzielten sie unter anderem auch bei 60 gesunden 4—6 Wochen alten Kälbern und 15 Schafen. Beachtenswert sind auch die Untersuchungen Aumanns (3), der die Faeces von 200 frisch geschlachteten Tieren des Hamburger Zentralviehhofes, darunter 48 Faeces von erwachsenen Rindern, auf Bakterien der Hogcholeragruppe untersuchte; es gelang diesem Autor nicht, auch nur einen Stamm aufzufinden, den er mit einem der als menschenpathogen betrachteten Vertreter der Paratyphusgruppe hätte identifizieren können.

Während also Morgan und Eckert im Rinderdarm Enteritisbakterien feststellten, ergaben die Untersuchungen von Titze und Weichel sowie von Aumann negative Resultate. Es ist demnach die Frage, ob im Darm gesunder Rinder Enteritisbakterien sich vorfinden, noch nicht geklärt und einer nochmaligen eingehenden Erörterung würdig. Durch Andrejew (1), Huber (26) und Schmidt und seine Mitarbeiter (54) wurden in letzter Zeit im Darminhalt von Schafen, Pferden und Schweinen Bakterien festgestellt, die mit den Bakterien der Hogcholeragruppe eine gewisse, auch serologische, Verwandtschaft haben, ohne jedoch mit ihnen identisch zu sein. Wir haben es uns zur Aufgabe gemacht zu untersuchen, ob auch im Rinderdarm solche Varietäten der Paratyphus-B-Bacillen existieren, und ob es gelingt, dieselben, ähnlich wie dies Huber bei seinen Pferdestämmen durchgeführt hat, von den pathogenen Bakterien der Hogcholeragruppe zu trennen.

### Versuchsanordnung.

Das gesamte Untersuchungsmaterial stammte von erwachsenen Rindern, die im Leipziger Schlachthofe geschlachtet worden sind. Auf das Geschlecht und die Aufzucht- bzw. Fütterungsweise wurde keine Rücksicht genommen, dagegen kamen Fäkalproben nur von vollkommen gesunden, 2—6 Jahre alten Tieren zur Verwendung. Der Nährzustand war bei allen Rindern ein ausgezeichneter. Die Entnahme der Proben geschah unmittelbar nach der Ausweidung aus den lebenswarmen Därmen in der Weise, daß mit sterilen Instrumenten der Darm durch einen Längsschnitt geöffnet und von der Darmwand mit steriler Platinöse Inhalt entnommen wurde. Dieses Material kam sofort in Reagenzgläser, die ca. 10 ccm sterile Rindfleischbouillon enthielten. Diese Methode wurde deshalb angewendet, weil es für die vorliegenden Untersuchungen nicht auf die Verteilung der Darmbakterien ankam, sondern in erster Linie auf die schnell wachsenden gramnegativen Stäbchen und gewissermaßen bei diesen erst eine Anreicherung stattfinden sollte. Die Weiterverarbeitung der Darminhaltproben geschah in der Weise, daß sie auf großen Platten von Lackmuskristallviolett-Milchzuckeragar nach v. Drigalski und Conradi und gleichzeitig auf Löfflers Malachitgrünagar ausgestrichen wurden. Als  $\alpha$ -Platte diente stets die Malachitgrünplatte, auf die je nach der Stärke der Bouillontrübung 10—20 Oesen verrieben wurde. Mit dem zur Verreibung benutzten Spatel wurden dann die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Drigalski-Conradi-Platten hergestellt. Nach ca. 20 Stunden wurden von den letzteren die verdächtigen Kolonien auf Schrägagar abgeimpft. Bei den Malachitgrünplatten wurde dagegen, sobald sich Kolonien entwickelt hatten, das Abschwemmungsverfahren nach Lentz und Tietz angewendet, das sich, wie gleich vorausgeschickt

sein soll, sehr gut bewährt hat. Von den einzelnen Platten sind zunächst mehrere verdächtige Kolonien abgestochen und alphabetisch benannt worden, stellte sich jedoch bei der weiteren Untersuchung eine Gleichartigkeit heraus, so wurde nur noch ein Stamm weiter gezüchtet und mit der Nummer des Tieres benannt, von dem er gewonnen war.

Auf vorstehende Weise wurde der Darminhalt von 100 Rindern untersucht, 60 Proben stammten aus den Dünndärmen, 40 aus Dickdärmen. Es stellte sich die überraschende Tatsache heraus, daß bei einer großen Anzahl der verarbeiteten Proben blauwachsende Kolonien zur Entwicklung kamen, daneben fanden sich alle Uebergänge vom deutlichen Blau bis zum Rot der Coli-Kolonien. Das Mengenverhältnis der verschiedenen Bakterienformen schwankte ganz erheblich, meist überwogen die rotwachsenden Coli-Stämme, jedoch fanden sich auch Platten vor, die fast ausschließlich blaue Kolonien aufwiesen; vielfach kamen beide in bunter Mischung vor, ohne Rücksicht ob die Probe aus dem Dünn- oder Dickdarm stammte.

Für die vorliegende Arbeit kam es nun im wesentlichen darauf an, blauwachsende Bakterienstämme zu erhalten, die in ihren weiteren morphologischen und biologischen Verhalten mit dem *B. paratyphi* B übereinstimmten oder diesem doch nahe kamen; daneben blieben allerdings auch andere Bakterienarten, die sich mehr dem *B. paratyphi* A bzw. dem *Typhusbacillus* näherten, nicht unberücksichtigt, nur mit dem Unterschiede, daß von den letztgenannten Bakterienarten nicht alle Stämme eingehend auf ihr morphologisches und biologisches Verhalten geprüft worden sind, sondern nur einige charakteristische Stämme eingehend zur Untersuchung herangezogen wurden.

Unter Ausschluß aller der auf *Conradi-Drigalski*-Nährboden blauwachsenden bzw. *Petruschky*sche Lackmusmolke bläuenden, jedoch Milch nach kürzerer oder längerer Zeit zur Gerinnung bringenden Bakterienstämme — sie bilden, wie hier angeführt sein mag, im normalen Rinderdarm einen verhältnismäßig hohen Prozentsatz — lassen sich unter den von uns untersuchten Keimen folgende Bakteriengruppen aufstellen:

- I. *Paratyphus*-B-ähnliche Bakterien.
- II. Bakterien wie No. I, doch aus Traubenzucker kein Gas bildend.
- III. *Paratyphus*-A-ähnliche Bakterien.
- IV. Typhusähnliche Bakterien.
- V. *Faecalis*stämme.

### **I. Die *Paratyphus*-B-ähnlichen Bakterien des normalen Rinderdarms.**

Aus den 100 verarbeiteten Faecesproben konnten in 12 Fällen Bakterien gezüchtet werden, die in Lackmusmolke und Milch ein gleiches Verhalten zeigten wie das *Bact. paratyphi* B. Unberücksichtigt blieben dabei solche Stämme, die Lackmusmolke nicht tief bläuten oder Milch nicht transparent machten, sondern sie unverändert ließen. Demnach standen uns für eingehendere Untersuchungen folgende Rinderstämme (RdSt) zur Verfügung: No. 28, 29, 51, 55, 69, 70, 71, 84, 89, 90, 97, 98. Die Stämme 51, 55, 69, 70, 71 sind aus dem Dünndarm, 28, 29, 84, 89, 90, 97, 98 aus dem Dickdarme gezüchtet worden.

Zum Vergleiche der im Rinderdarme aufgefundenen *Paratyphus*-B-ähnlichen Bakterien mit typischen Vertretern der *Hogcholera*- oder *Gärtner*-Gruppe standen uns 14 *Paratyphus*-B-Kulturen (PB), 5 *Sui*-

pestifer-Kulturen (Sp), ein Mäusetyphus- (MT) und ein Enteritidis-Gärtner- (EG) Stamm zur Verfügung. Es handelt sich um folgende Stämme:

Menschen-Paratyphus B: Claus, Sambaß, Saarbrücken, Infect, Mirus, Müller, Schinken, Frau Müller, Fritz, Institut, Mathes.

Kälber-Paratyphus B: Horn, 89, 98.

Suipestifer: Ostertag, Wassermann, Gans, Höchst, O neu.

Mäusetyphus und Enteritidis Gärtner.

Außer diesen Kulturen wurden 5 aus verschiedenen Rinderdärmen gezüchtete typische Coli-Stämme, sowie die Huberschen Pferdestämme (34) und einige in einer besonderen Arbeit eingehend beschriebene, aus Fliegenkot isolierte Kulturen zu vergleichenden Studien herangezogen.

Die Stämme PB Mathes, Sp Höchst, Sp O neu wurden dem Veterinärinstitut von Herrn Dr. Poppe, wissenschaftlichem Hilfsarbeiter im Kaiserlichen Gesundheitsamte in Berlin, die Stämme PB 89, 98 von Prof. Dr. T. M. Schmitt, Direktor des Gesundheitsamtes der Landwirtschaftskammer für die Provinz Pommern, in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt. Alle übrigen Kulturen erhielten wir dank des freundlichen Entgegenkommens des Herrn Privatdozenten Dr. Paul Schmidt und Dr. Trautmann aus dem Hygienischen Institut der Universität Leipzig.

Alle Rinderstämme sowohl wie die genannten Vergleichsstämme wurden vor Beginn der Untersuchung über Lackmus-Laktoseagarplatten geschickt, von denen eine oder mehrere Kolonien abgeimpft wurden, um sie durch Züchtung auf Gelatine, Lackmusmolke und Milch, sowie durch Herstellung von Gram-Präparaten auf ihre Reinheit zu prüfen.

Nach erfolgter Reinzüchtung wurden alle Vergleichsstämme durch entsprechende Sera auf ihre Agglutinationsfähigkeit untersucht.

Ueber die Färbbarkeit, die Beweglichkeit, das kulturelle Verhalten und das Gärungsvermögen der RdSt gibt die nachstehende Tabelle näheren Aufschluß:

Stämme	Gramfestigkeit	Eigenbewegung	Gelatine (Verflüssigung)	Lackmusmolke (Umschlag nach Tagen)	Milch (Gelbfärbung ohne Gerinnung)	Traubenzucker (Gasbildung)	Milchzucker (Gasbildung)	Glyzerin		Schwefel- wasserstoff- entwicklung
								(Säuerung)	(Gasbildung)	
RdSt 28	—	++	—	12	+	+	—	+	—	—
RdSt 29	—	—	—	2	+++	++	—	+	+++	—
RdSt 51	—	—	—	14—20	+	+	—	+	—	—
RdSt 55	—	++	—	2—3	+	++	—	+	++	++
RdSt 69	—	+	—	2	+++	++	—	+	+	+++
RdSt 70	—	+++	—	8	++	+++	—	+	—	+++
RdSt 71	—	—	—	4	++	++	—	+	+	+++
RdSt 84	—	+	—	2—3	+++	++	—	+	++	+++
RdSt 89	—	—	—	14—20	++	+	—	+	—	—
RdSt 90	—	—	—	8	++	++	—	+	+++	+++
RdSt 97	—	—	—	14	++	+ Spur	—	+	—	+ Spur
RdSt 98	—	—	—	8	++	+	—	+	++	+++

Negativer Befund = —, positiver Befund = +, ++ u. +++ sollen den Grad des Befundes ausdrücken.

### Morphologie, Färbbarkeit und Beweglichkeit.

Es handelte sich bei den isolierten Bakterienstämmen stets um gram-negative Stäbchen von kurzer, plumper Gestalt und mit abgerundeten Enden. Die Größe der Stäbchen schwankte etwas bei den einzelnen Kulturen, doch ließen sich damit generelle Unterschiede nicht aufstellen; nur Stamm 98 wich erheblich in seiner Form von den übrigen Stämmen ab, so daß hier eine Abtrennung möglich war. Dieser Stamm zeigte stets ganz kurze, fast kokkenartige Stäbchen. Die Bakterien sämtlicher Stämme liegen in der Regel einzeln, seltener zu zweien oder dreien hintereinander; von Kettenbildung konnte man nicht sprechen; desgleichen war auch keine Sporenbildung zu beobachten, obwohl besonders bei Methylenblaufärbung in der Bakterienzelle mitunter hellere Stellen auftraten. Im übrigen färbten sich die Bakterien mit allen gebräuchlichen Anilinfarben. Nach der Methode von Löffler und Peppler gelang es, bei einigen beweglichen Stämmen Geißeln nachzuweisen. Die morphologischen Verhältnisse der Rinderstämmen gestatten demnach eine Trennung derselben von echten Paratyphus-B-Bakterien oder von Coli-bakterien nicht. Hinsichtlich ihrer Beweglichkeit ließ sich bei unseren 12 Stämmen keine Gleichmäßigkeit feststellen. RdSt 70 war sehr lebhaft beweglich. RdSt 28 und 55 waren ziemlich lebhaft, RdSt 69 und 84 dagegen nur mäßig beweglich. Alle übrigen Stämme zeigten keine Eigenbewegung. Die Beobachtungen wurden im hängenden Tropfen bei Zimmertemperatur an jungen, eben dem Brutschrank entnommenen Agar-, Bouillon- bzw. Traubenzuckerbouillonkulturen vorgenommen; die unbeweglichen Stämme wurden mehrmals und von verschiedenen alten Nährböden untersucht. Nach der Literatur zeichnet sich *Bact. paratyphi B* im allgemeinen durch eine lebhaft Eigenbewegung aus, doch ist die Beweglichkeit bei den Bakterien der Coli-Typhusgruppe keine so konstante Eigenschaft, daß sie zur grundsätzlichen Unterscheidung von Bakterienarten gebraucht werden kann. Burri und Andrejew (5) ist es gelungen, aus den Reinkulturen eines lebhaft beweglichen Stammes der Coli-Typhusgruppe zwei Zellen zu isolieren, von denen die eine eine lebhaft bewegliche, die andere eine unbewegliche Nachkommenschaft lieferte. Wir glauben deshalb mit Rücksicht auf diese Umstände nicht berechtigt zu sein, die unbeweglichen unserer RdSt von den Bakterien der Hogcholera- bzw. Gärtner-Gruppe abzutrennen.

### Kulturelles Verhalten auf gewöhnlichen Nährböden.

Alle Stäbchen wuchsen leicht bei Zimmer- und Bruttemperatur, das Temperaturoptimum lag ebenso wie bei den Menschenparatyphusstämmen bei 37° C. Anaërobes Wachstum war vorhanden, jedoch schwächer als unter aëroben Bedingungen. Auf Schrägagar bildeten sie nach 16—20-stündigem Wachstum einen gleichmäßigen, grauweißen, glänzenden Rasen, wobei sie das Kondenswasser stark trübten. Im allgemeinen war der Belag dick und undurchsichtig, erinnerte also mehr an das Wachstum von Coli-Bakterien als von Paratyphusstämmen mit ihren bläulich-durchscheinenden Rasen. Der Kulturbelag war weich und leicht abnehmbar bzw. abspülbar. Eine gewisse Ausnahme machte nur Stamm 98, der stets einen dünnen, durchscheinenden Belag bildete. Die Agarstichkultur zeigte nichts Besonderes; es bildet sich ein grauweißer Faden ohne Ausläufer und an der Oberfläche ein sich ziemlich rasch verbreitender Rasen. Im Gelatinestich entstand ebenfalls ein zu-

sammenhängender weißgrauer Faden und an der Einstichstelle ein Belag von gleicher Farbe. Verflüssigung der Gelatine trat bei keinem der genannten Stämme ein. Bouillon begann sich nach kurzer Brütezeit (4—6 Std.) gleichmäßig zu trüben. Oft bildete sich nach einigen Tagen ein mehr oder weniger dichtes Oberflächenhäutchen unter gleichzeitiger Klärung der Bouillon und Bildung eines Bodensatzes, der sich durch Schütteln wieder gleichmäßig verteilen ließ.

Auf der Malachitgrünplatte (Malachitgrün 120 Höchst) entwickelten sich milchigtrübe, etwas durchscheinende Kolonien, die den Agar nach kurzer Zeit entfärbten. Auf Lackmus-Milchzucker-Kristallviolettagar nach v. Drigalski und Conradi (12) wuchsen die Rinderstämme ohne Veränderung des Nährbodens mit blauen Kolonien. Ihr Wachstum auf Endos Fuchsinagar (14) war ein üppiges unter Bildung von farblosen bis rosaroten Kolonien, welche die Farbe des Agars anfangs wenig beeinflussten, später aber eine intensivere Rotfärbung annahmen.

Aus allen diesen Angaben geht hervor, daß auf den angeführten Nährböden eine scharfe Trennung zwischen echten Menschenparatyphusstämmen einerseits und Rinderstämmen andererseits nicht möglich ist.

Petruschkysche Lackmusmolke (Kahlbaum, Berlin) wurde durch sämtliche 12 Rinderstämme nach 5—10 Stunden rot oder violettrot gefärbt und dabei leicht getrübt (Säurebildung).

Nach einiger Zeit trat eine deutliche Bläuung der Lackmusmolke ein, die, anfangs dunkelviolett allmählich in ein reines Blau, oft unter Bildung eines Oberflächenhäutchens, überging. Der Umschlag geschah allerdings, wie aus der Tabelle schon hervorgeht, zu recht verschiedenen Zeiten, jedenfalls meist langsamer als bei echten Paratyphusstämmen. Einige Rinderstämme (70, 90, 98) brauchten bis zum tiefen Blau 8 Tage, RdSt 28, 51, 89, 97 sogar 12—20 Tage.

Milch wurde auch nach mehrwöchigem Stehen im Brutschranke von keinem Rinderstamme zur Gerinnung gebracht, dagegen zeigte sich bei den meisten Kulturen schon nach einigen Tagen eine Aufhellung und Gelbfärbung. Nach 14—18 Tagen war die Milch in mehr oder weniger hohem Grade gelb und durchscheinend. Nach wochenlangem Stehen bei Bruttemperatur nahm sie unter zunehmender Eindickung eine mehr braungelbe Farbe und eine immer zähflüssiger werdende, schließlich sirupartige Konsistenz an. Bei den Stämmen 29, 69, 84 stellten sich die Veränderungen rasch ein, während sie bei RdSt 70, 71, 89, 90, 97, 98 weniger rasch eintraten und endlich bei den Stämmen 51, 55 nur langsam zu einer Gelbfärbung führten. Durch Stamm 28 wurde die Milch am wenigsten beeinflusst, er vermochte auch nach mehreren Wochen sie nur sehr schwach gelblich zu färben.

Bei der Prüfung des Gärungsvermögens unserer Rinderstämme haben wir uns auf drei Kohlenstoffverbindungen beschränkt. Außer Dextrose und Laktose wurde Glycerin zu den Gärversuchen herangezogen, da dieser Körper Huber (25) bei der Unterscheidung seiner Pferdestämme von den Bakterien der Hogcholeragruppe gute Dienste geleistet hatte.

Während die Bakterien der Hogcholeragruppe das Glycerin allmählich unter schwacher Säurebildung zersetzten, zum Teil aber innerhalb 14 Tagen überhaupt nicht angriffen und keine oder nur geringe Gasbildung zeigten, bildeten die Huberschen Pferdestämme in Glycerinnährböden rasch und kräftig Säure und Gas.

Die Nährböden, die zur Prüfung der Stämme auf ihr Gärungsvermögen verwendet wurden, bestanden aus:

Aqua destill.	100,0
Pepton Witte	1,0
Natr. chlorat.	0,5

Zu dieser Peptonkochsalzlösung wurden nach erfolgter Sterilisation 1 Proz. der betreffenden Kohlenstoffverbindung und 5 Proz. Lackmuslösung Kubel-Tiemann hinzugefügt. Der fertige Nährboden wurde in Reagenzgläser mit Gärungsröhrchen abgefüllt und an zwei aufeinanderfolgenden Tagen im strömenden Dampfe während je 10 Minuten sterilisiert. Zur Prüfung auf völlige Keimfreiheit wurde er sodann 2 Tage lang in den Brutschrank gestellt.

Neben den Rinderstämmen wurden sämtliche anfangs angeführten Vergleichsstämme zu den Gärungsversuchen herangezogen.

#### Traubenzucker.

Paratyphus-B-, Suipestifer-, Mäusetyphus- und Enteritidis-Gärtner-Stämme bilden alle kräftig Säure und Gas.

Pferdestämme bilden ebenfalls kräftig Säure und Gas mit Ausnahme von PfSt 39, der zwar Säure, aber kein Gas bildet.

Rindercolistämme bilden alle kräftig Säure und Gas.

Rinderstämmen bilden zwar sämtlich Säure und Gas, doch ist die Gasentwicklung fast durchweg geringer als bei echten Paratyphus B-Stämmen. Kräftige Gasbildung erzeugt nur RdSt 70, während RdSt 29, 55, 69, 71, 84, 90 nur mäßig Gas entwickeln. Geringe Gasbildung entsteht bei den RdSt 28, 51, 89, 98, bei Stamm 87 endlich nur eine Spur.

#### Milchzucker.

Paratyphus-B-, Suipestifer-, Mäusetyphus- und Enteritidis-Gärtner-Stämme: Weder Säure- noch Gasbildung.

Pferdestämme: Weder Säure- noch Gasbildung.

Rindercolistämme: Kräftige Säure- und Gasbildung.

Rinderstämmen: Weder Säure- noch Gasbildung.

#### Glyzerin.

Paratyphus-B-, Suipestifer-, Mäusetyphus- und Enteritidis-Gärtner-Stämme: meist schwache Säurebildung, zum Teil keine Säurebildung; keine oder nur sehr geringe Gasbildung.

Pferdestämme: Kräftige Säure- und Gasbildung. Ausnahmen: PfSt 10: schwache Säurebildung und noch schwächere Gasbildung. PfSt 39: Schwache Säure-, keine Gasbildung.

Rindercolistämme: Säure- und Gasbildung.

Rinderstämmen: Säurebildung. Ausnahme: RdSt 28: keine Säurebildung. Die Gasbildung variiert bei den einzelnen Stämmen ganz erheblich. RdSt 28, 51, 70, 89, 97 bilden überhaupt kein Gas; RdSt 69, 71 zeigen geringe, RdSt. 55, 84, 98 mäßige, RdSt 29, 90 kräftige Gasbildung.

Bei den angeführten Versuchen treten demnach gewisse Unterschiede zwischen den Bakterien der Hogcholeragruppe und den Rinderstämmen hervor. So wird von den Rinderstämmen bei der Vergärung von Traubenzucker im allgemeinen weniger Gas entwickelt als von echten Paratyphusstämmen; doch ist dieser Unterschied unter Umständen so wenig markant, daß sich hierauf eine sichere Differenzierung beider Bakterienarten nicht basieren läßt. Die Intensität der Säurebildung in Glyzerinnährböden ist bei beiden Bakteriengruppen im allgemeinen übereinstimmend. Bezüglich der Gasbildung aus Glyzerin treten dagegen wenigstens bei einem Teil der Rinderstämmen Unterschiede gegenüber den Paratyphusstämmen in Erscheinung; die RdSt 29, 55, 84, 90, 98 insbesondere dokumentieren durch ihr Gasbildungsvermögen eine erhebliche Abweichung vom Typus der Hogcholeragruppe. Doch glauben wir dem



Gärungsvermögen gegenüber verschiedenen Zuckerarten als Unterscheidungsmittel der Bakterien der Coli-Typhusgruppe keine so große Bedeutung beimessen zu können, wie dies von anderen Autoren geschehen ist. Bei so nahe verwandten Bakterien, die so zahlreiche Zwischenformen aufweisen, wird eine Trennung auf Grund verschiedener Gärungsenergie wohl stets nur für gewisse Haupttypen durchführbar sein. Die Versuche Tworts (65), nach denen Mikroorganismen nach längerem Fortzüchten schließlich Zuckerarten angriffen, die sie ursprünglich nicht vergären konnten, zeigen, daß auch das Gärungsvermögen wie manche andere Eigenschaften der Bakterien, Schwankungen unterworfen ist. Es kann also nach alledem aus dem Gärungsvermögen noch kein prinzipieller Unterschied zwischen Bakterien der Hogcholeragruppe und Rinderstämmen gemacht werden, abgesehen vielleicht von den Rinderstämmen 29, 55, 84, 90, 98, die durch ihre Gasbildung in glyzerinhaltigen Nährböden erheblich abweichen.

#### Untersuchungen auf Entwicklung von Schwefelwasserstoff.

Die Untersuchung wurde in der üblichen Weise mit Streifen von Bleiacetatpapier an Kulturen vorgenommen, die mit gleichartiger Bouillon (Peptongehalt 1 Proz.) angelegt waren. Zum Vergleiche wurden ebenfalls die anfangs angeführten verschiedenen Stämme herangezogen.

Alle Stämme der Paratyphusgruppe sowie Enteritidis Gärtner haben schon nach ca. 24 Stunden mäßig bis kräftig Schwefelwasserstoff gebildet, ebenso die Suipestiferstämmе. Nach 3 Tagen ist das Bleiacetatpapier in allen Kulturröhrchen stark geschwärzt. Nach 24 Stunden zeigen die Kulturen der Pferdestämme nicht eine Spur von Schwefelwasserstoffbildung. Nach 3 Tagen sind die meisten Papierstreifen schwach, nach 7 Tagen schwach oder mäßig geschwärzt. Stamm 10 und 94 entwickeln Spuren bzw. kein  $H_2S$ . Hinsichtlich der Rinderstämmе lassen die Versuche kein einheitliches Bild erkennen. Einige bilden kräftig, andere überhaupt keinen Schwefelwasserstoff. Stämme 69, 70, 71, 84, 90, 98 zeigen kräftige Schwefelwasserstoffentwicklung, bei Stamm 55 ist sie mäßig, Stamm 97 bildet Spuren und bei den RdSt 28, 29, 51, 89 ist nach 3 Tagen überhaupt keine  $H_2S$ -Bildung zu beobachten. Eine generelle Abtrennung der Rinderstämmе von echten Paratyphusstämmen ist demnach durch die Bildung von Schwefelwasserstoff nicht möglich, da ein Teil der Stämme ebenso reichlich  $H_2S$  entwickelt wie die der Paratyphusgruppe. Eine gewisse Trennung ist nur bei den Stämmen 28, 29, 51, 89 und 97 infolge ihres negativen Verhaltens durchführbar.

#### Untersuchung auf Bildung von Proteinochrom (Tryptophan).

Erdmann und Winternitz (15) fanden durch vergleichende Untersuchungen an verschiedenen 5-proz. Peptonbouillonkulturen in der Bildung von Proteinochrom eine Reaktion, die eine Trennung von Paratyphus- und Coli-Bakterien ermöglichte. Dieser Stoff von rotvioletter Farbe entwickelte sich bei angesäuerten Kulturen von Paratyphusbacillen unter Zusatz von Chlor oder Brom, und ist unter anderem auch von Kayser (30) und Zupnick (69) bei Paratypuskulturen gefunden worden. Nach Burri und Andrejew (5) handelt es sich dabei um nichts anderes als um das seit längerer Zeit bekannte, früher Skatol-

aminoessigsäure, in neuerer Zeit aber als Indolaminopropionsäure aufgefaßte Tryptophan.

Die Untersuchung wurde nach 12-tägigem Wachstum im Brutschrank ausgeführt. Eine zweite Prüfung erfolgte an Kulturen, die weitere 6 Tage bei Zimmertemperatur gewachsen waren. Nach Zusatz von einigen Tropfen Essigsäure an die Bouillonkulturen wurden sie mit frisch bereitetem Chlorwasser überschichtet. Neben den 12 Rinderstämmen wurden sämtliche Paratyphus- und Suipestifer-, Rinder-Coli- und die Paratyphus-B-ähnlichen Bakterien des Pferdedarmes geprüft, das Resultat der Untersuchungen war besonders bei 18-tägigen Kulturen gut zu sehen. Bei allen Paratyphus- und Suipestifer-Stämmen entstand an der Berührungsstelle der Bouillon und des Chlorwassers eine rotviolette oder braunviolette Zone, die bei den Coli- und Pferdestämmen nicht festgestellt werden konnte.

Recht verschiedenartig verhielten sich auch hier wieder die Rinderstämme. Stamm 55, 70, 90, 97, 98 bilden Proteinochrom, bei Stamm 28, 29, 69, 84, 89 ist die Reaktion negativ und bei Stamm 51 und 71 zweifelhaft ausgefallen. Auf Grund dieses Resultates können nur die beiden letzten Reihen der Rinderstämme mit Hilfe der Proteinochromreaktion von den echten Paratyphusstämmen abgetrennt werden, während die ersteren die gleiche Reaktion geben und dadurch mit ihnen übereinstimmen.

#### Untersuchung auf Bildung von Indol.

Zur Differenzierung gewisser Bakterien, besonders aber der Paratyphusgruppe einerseits und der Coli-Gruppe andererseits, spielt der Nachweis von Indol in den verschiedenen flüssigen Nährböden eine große Rolle. Neuerdings hat Huber (26) bei seinen vergleichenden Studien über Indolbildung in dieser Reaktion ein charakteristisches Unterscheidungsmerkmal zwischen den Paratyphus-B-ähnlichen Bakterien des Pferdedarmes und den pathogenen Vertretern der Hogcholera gefunden. Auf der einen Seite konstatierte er kräftige Indolbildung, während er andererseits das Fehlen jeder Indolbildung auch bei mehreren Wochen alten Kulturen feststellte, gleichgültig, ob er dabei zur Herstellung der Kulturen Pepton Witte oder Pepton Adamkiewitsch mit oder ohne Kochsalzzusatz verwandte. Anfangs bestand die Indolreaktion in der Bildung eines roten Farbstoffes, des salpetersauren Nitrosoindols, das nach Zusatz von salpetriger Säure und reiner Schwefelsäure auf eine Indollösung entsteht. In dieser Weise war von Salkowski eine Methode in die Bakteriologie eingeführt worden, die bis in die letzte Zeit fast ausschließlich zum Indolnachweis herangezogen wurde. Durch die älteren Untersuchungen von Lösenner (40) und die neueren von Huber (26), Burri und Andrejew (5) stellte sich heraus, daß bei Behandlung der Kulturen mit Kaliumnitrit und Schwefelsäure Rotfärbungen auftreten können, ohne daß Indol zugegen ist. Nur wenn der gebildete rote Farbstoff in Amylalkohol löslich war — eine Eigenschaft, die von Pöhl (47) festgestellt wurde — konnte man mit einer gewissen Sicherheit auf das Vorhandensein von Indol schließen. Zweifellos sind durch Unterlassung der Ausschüttelung mit Amylalkohol oder der Destillation — Indol ist in Wasserdampf flüchtig — Irrtümer zustande gekommen.

Auch durch Crossonini (11) und Andrejew (1), der vorher selbst, wie auch Poppe (48) zu falschen Schlüssen gelangt war, wurde

bestätigt, daß in Bakterienkulturen, die zweifellos kein Indol bilden, gewisse Substanzen vorkommen können, die mit Nitrit und Schwefelsäure eine rote Färbung geben.

Es wurde daher bei den folgenden Untersuchungen auf Indolbildung von der Salkowskischen Methode vollständig abgesehen und allein die von Böhme (4) in die Bakteriologie eingeführte Indolprobe nach Ehrlich angewendet, mit der in Peptonwasser noch in einer Verdünnung von 1:1000000 eine sehr deutliche Reaktion zu erzielen war. Crossonini (11) konnte sogar durch eine Modifikation der Technik Indol in einer Verdünnung von 1:5000000 nachweisen.

Sämtliche Indolproben wurden an Peptonwasserkulturen ausgeführt, die bei negativem Ausfall bis zu 3 Wochen im Brutschrank gelassen wurden.

Alle für diese Versuche verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Gröbler-Leipzig bezogen.

Reagens A.	Paradimethylamidobenzaldehyd	4,0
	96-proz. Alkohol	380,0
	konz. Salzsäure	80,0
Reagens B.	Kaliumpersulfat in gesättigter wässriger Lösung.	

Zu ca. 10 ccm der zu prüfenden Kulturflüssigkeit wurden 5 ccm von Reagens A und 5 ccm von B gegeben und geschüttelt. In zweifelhaften Fällen wurde mit Chloroform ausgeschüttelt. Vergleichende Untersuchungen erstreckten sich auf 14 Paratyphus-B-, 5 *Suipestifer*-, 5 Rinder-Coli-, die 7 Huberschen Pferdestämme, 1 Mäusetypus- und 1 Enteritidis-Gärtner-Stamm und unsere 12 Rinderstämme.

Alle pathogenen Stämme der Hogcholeragruppe inkl. des Ent-Gärtner-Stammes bilden auch nach 3 Wochen langer Brutung kein Indol.

Die Pferdestämme bilden kräftig Indol, desgleichen auch die 5 Rinder-Coli-Stämme.

Die 12 Rinderstämme weichen in ihrem Verhalten voneinander erheblich ab. Ist Indolbildung vorhanden, so tritt bereits nach 3 Tagen eine deutliche Reaktion ein; es geschieht dies bei den Stämmen 28, 29, 69, 84, 89. Alle übrigen Stämme verhalten sich auch bei 3 Wochen alten Kulturen negativ, sie stimmen demnach in ihrem Verhalten mit den echten Vertretern der Hogcholeragruppe überein, während sie sich von den Huberschen Paratyphus-B-ähnlichen Bakterien des Pferdedarmes scharf unterscheiden. Es geht daher aus diesen vergleichenden Untersuchungen hervor, daß die Indolbildung nur für einen Teil der Darmstämme als charakteristisches Unterscheidungsmerkmal gegenüber den Vertretern der Hogcholeragruppe angesehen werden kann.

Eine scharfe Trennung, wie sie Huber (34) durch die Indolreaktion für sämtliche gefundenen Paratyphus-B-ähnlichen Pferdedarmstämme ausführen konnte, ist demnach für die Rinderdarmstämme nur in beschränktem Maße möglich. Eine Tatsache, die mit den Erfahrungen P. Schmidts (54) übereinstimmt, der bei  $\frac{2}{3}$  der aus dem normalen Schweinsdarm gezüchteten kulturell Paratyphus-B-ähnlichen Kulturen, auch der agglutinablen, Indol durch die Ehrlichsche Reaktion feststellen konnte, während die übrigen Stämme kein Indol bildeten.

Vergleicht man die einzelnen im Darm des Rindes vorkommenden Paratyphus-B-ähnlichen Stämme auf ihr Verhalten gegenüber eiweißhaltigen Nährsubstanzen, im vorliegenden Falle gegen Peptonlösungen, so tritt eine eigentümliche Wechselbeziehung zutage. Die folgende Tabelle veranschaulicht diese sehr deutlich.

Rinderstamm No.	Indol	Proteinochrom	Rinderstamm No.	Indol	Proteinochrom
28	+	—	71	—	Spur
29	+	—	84	+	—
51	—	Spur	89	+	—
55	—	+	90	—	+
69	+	—	97	—	+
70	—	+	98	—	+

Alle Stämme, die kein Indol bilden, bilden Proteinochrom (Tryptophan) und umgekehrt. Es ist dies eine Erscheinung, wie sie bereits Burri und Andrejew (5) beobachtet hatten. Da nach diesen Autoren Indol in Tryptophan enthalten ist, so werden „solche Bakterienkulturen, die das letztere zu spalten vermögen, bei ihrer Arbeit kaum auf halbem Wege stehen bleiben, sondern im Laufe der Zeit alles Tryptophan zerstören, bzw. Indol aus seiner Bindung befreien“. Paratyphusbacillen und nahe Verwandte scheinen demnach Tryptophan überhaupt nicht anzugreifen, es müßten doch sonst nach 3 Wochen langem Bebrüten durch die empfindliche Ehrlichsche Reaktion mindestens Spuren von Indol nachzuweisen sein.

### Agglutination.

Bei den folgenden Agglutinationsversuchen kam es im wesentlichen darauf an, einmal das Verhalten der Paratyphus-B-ähnlichen Stämme des Rinderdarmes gegenüber einer Anzahl hochwertiger Seris der Hogcholeragruppe bzw. gegenüber Normalseris festzustellen und andererseits eine Prüfung vorzunehmen, inwieweit Vertreter der pathogenen Hogcholeragruppe durch Immunsere von Rinderstämmen beeinflusst werden. Zu letztgenannten Zwecken sind eine Anzahl Seris hergestellt worden, auf die in folgendem näher eingegangen werden soll.

Vorausschicken wollen wir, daß die Agglutinationsversuche nach Pfeiffer und Kolle (46) makroskopisch vorgenommen wurden, indem eine Normalöse ca. 18-stündiger Agarkultur in 1 ccm der betreffenden Serumverdünnung im Reagensglase verrieben wurde. Nach 2- und 6-stündigem Verweilen im Brutschranke wurden die Resultate mit bloßem Auge oder unter Zuhilfenahme einer schwachen Lupe abgelesen. Von einer mikroskopischen Feststellung der Agglutinationshöhe, wie sie von Korte (35) und Trautmann (64) gehandhabt wurde, wurde nur in zweifelhaften Fällen Gebrauch gemacht.

Von jedem der gebrauchten Sera wurden Verdünnungen von 1 : 50 und 1 : 75 vorrätig gehalten. Die weiteren Verdünnungen wurden aus diesen Flüssigkeiten durch fortlaufendes Mischen von je 1 ccm Serumverdünnung und 1 ccm  $\frac{1}{4}$ -proz. physiologischer Karbolkochsalzlösung nach Bedarf hergestellt. Alle Agglutinationsversuche wurden 2mal, mehrfach jedoch auch 3- und 4mal ausgeführt, so daß die angeführten Resultate als einwandfrei angesehen werden können. Bei mehrmaliger Agglutination eines Stammes und bei etwas abweichenden Agglutinationswerten wurde die mittlere Höhe angenommen. Als Kontrolle diente bei jedem Versuche die Verreibung der betreffenden Kultur in Karbolkochsalzlösung.

Zu unseren Untersuchungen standen folgende Immunsere zur Verfügung:

- 2 Paratyphus-B-Sera
- 1 Suipestifer-Serum
- 2 Enteritidis-Gärtner-Sera
- 4 Normalsera vom Pferde
- 4 Normalsera vom Rinde
- 4 Normalsera vom Kaninchen
- 5 Sera von Paratyphus-B-ähnlichen Stämmen des Pferdedarmes
- 3 Rinder sera von RdSt 29, 69, 71
- 1 Paratyphus-C-Serum.

Alle verwendeten Sera wurden außer mit den gefundenen Rinderstämmen mit mehreren PB- bzw. Sp-Stämmen, sowie mit den Paratyphus-B-ähnlichen Pferdestämmen geprüft. Die höchsten, d. h. die nach 6 Stunden festgestellten Agglutinationswerte sind im folgenden für jedes einzelne Serum angeführt. Die bei der Agglutination ermittelten Zahlen sind außerdem tabellarisch zusammengestellt.

### 1. Polyvalentes Paratyphus-B-Serum vom Kaninchen.

Titer 1 : 4—8000.

Dieses Serum war von Huber mit den Stämmen PB Mirus, Claus, Saarbrücken, Infekt, Frau Müller hergestellt worden.

#### Agglutinationsversuche.

PB Mirus 8000, Sambaß 6000, Claus 4000.

Sp Ostertag 8000, Wassermann 6000.

PfSt 2, 21, 23, 34: 600—2400; PfSt 10: 400—600; PfSt 94 und 39: —

RdSt 29, 69: 2000—2400.

RdSt 28: 400; RdSt 89: 150; RdSt 51: 50; RdSt 55, 70, 71, 84, 90, 97: —

### Paratyphus-B-Serum „Kolle“ vom Pferde.

Titer 1 : 10 000. Bezogen als Trockenserum vom Institut séro-therapique et vaccinal, Suisse, Berne.

Die Auflösung geschah nach Vorschrift mit sterilem, destilliertem Wasser im Verhältnis 1 : 10. Die Lösung ging sehr langsam von statten.

#### Agglutinationsversuche.

PB Mirus 16 000, Claus 16 000, Frau Müller 15 000, Infekt 12 000, Saarbrücken 10 000, Sambaß 5000, Schinken 4000.

SP Höchst 5000, Ostertag 4000, Gaus 4000, Wassermann 400.

PfSt 2, 21, 23, 34: 800—1800; PfSt 10: 250—300; PfSt 94: 50; PfSt 39: —.

RdSt 69: 1600; RdSt 29, 84: 500—800; RdSt 28, 71, 89, 90, 97: 150—200;

RdSt 51, 55, 70: —.

### Suiferin.

Das verwendete Suiferin wurde von den Höchster Farbwerken, vorm. Meister, Lucius und Brüning, bezogen. Nach Mitteilung der Firma wird das Serum unter Verwendung von 5 Suipestifer-Stämmen hergestellt.

#### Agglutinationsversuche.

PB Mirus 600, Claus 400, Saarbrücken 400, Frau Müller 1600.

SP Ostertag 2600, Höchst 2400, Wassermann 4800, Oneu 6400.

PfSt 2, 21, 23, 34: 200—400; PfSt 10: 50; PfSt 39, 94: —.

RdSt 29: 2400; RdSt 69: 400; RdSt 28, 71, 84, 89, 90: 100—150; RdSt 51, 97: 50; RdSt 55, 70: —.

### Univalentes Enteritidis Gärtner-Serum „I. f. I.“ vom Kaninchen.

Dieses Serum wurde aus dem Königl. Preußischen Institut für Infektionskrankheiten als Trockenserum bezogen. Als Titer war 1 : 4000 angegeben. Die Lösung geschah mit sterilem, destilliertem Wasser im Verhältnis 1 : 10.

## Agglutinationsversuche.

Enteritidis Gärtner: 2400.

PB Claus 300, Infekt 300, Frau Müller 300, Sambaß 200, Mirus 100.

SP Ostertag 400, Oneu 200.

PfSt 2, 21, 23, 34: 50—75; PfSt 10: 200; PfSt 39, 94: —.

RdSt 29: 2000; RdSt 28, 89: 400—600; RdSt 51, 69: 100—200; RdSt 55, 71, 84, 90, 97: 50; RdSt 70: —.

Univalentes Enteritidis-Gärtner-Serum vom Kaninchen,  
Titer 1:4000.

Dieses Serum wurde von Huber hergestellt. Die Immunisierung erfolgte durch subkutane und intravenöse Injektionen von 24-stündigen Agarkulturen, die durch  $\frac{1}{2}$ —1-stündiges Erhitzen bei 60° C abgetötet worden waren.

## Agglutinationsversuche.

Enteritidis Gärtner: 4800.

PB Mirus, Sambaß, Infekt, Frau Müller, Claus: 50.

Sp Ostertag: —; Oneu: 50.

PfSt 2, 21, 23, 34: 150—250; PfSt 10: 50; PfSt 39, 94: —.

RdSt 29: 3000; RdSt 69: 600; RdSt 51, 55, 89, 97: 200—300; RdSt 28, 84, 90: 150; RdSt 70, 71: 50.

Zur besseren Uebersicht der einzelnen Agglutinationswerte, die mit den verschiedenen Sera an Rinderstämmen erzielt wurden, soll die folgende Tabelle dienen. Die erstgenannten Zahlen geben die Agglutinationshöhe nach 2 Stunden, die an zweiter Stelle stehenden diejenige nach 6 Stunden an.

Rinder- stämme	Polyvalentes Paratyphus-B- Serum vom Kaninchen Titer 1:4—8000	Paratyphus-B- Serum „Kolle“ vom Pferd Titer 1:10000	Suiferin	Enteritidis Gärtner-Serum „I. f. I.“ vom Kaninchen Titer 1:4000	Enteritidis Gärtner-Serum vom Kaninchen Titer 1:4000
RdSt 28	200, 400	50, 200	50, 100	250, 400	100, 150
RdSt 29	1600, 2400	500, 800	1200, 2400	800, 2000	1600, 3000
RdSt 51	—, 50	—, —	50, 50	50, 100	200, 300
RdSt 55	—, —	—, —	—, —	—, 50	200, 300
RdSt 69	1200, 2000	800, 1600	250, 400	50, 200	200, 600
RdSt 70	—, —	—, —	—, —	—, —	50, 50
RdSt 71	—, —	100, 200	100, 150	—, 50	—, 50
RdSt 84	—, —	300, 500	100, 200	—, 50	100, 150
RdSt 89	100, 150	50, 150	50, 100	300, 600	100, 200
RdSt 90	—, —	100, 150	50, 100	—, 50	100, 150
RdSt 97	—, —	50, 150	—, 50	—, 50	100, 200
RdSt 98	+	+	+	+	+

Zu den in obiger Tabelle niedergelegten Angaben sei zunächst erwähnt, daß RdSt 98 in gleicher Weise in Paratyphus-B- und Enteritidis Gärtner-Serum wie auch in physiologischer Kochsalzlösung spontan agglutiniert. Völlig ebenso wie in spezifischen Seris verhält sich dieser Stamm, wie vorausgeschickt sei, in Normalseris vom Pferd, Rind und Kaninchen. Ein gewisser Unterschied in der Agglutination des Stammes 98 durch Sera einerseits und durch Kochsalzlösung andererseits besteht nur darin, daß die körnige Trübung in physiologischer Kochsalzlösung nach 2—6-stündigem Aufenthalt im Brutschrank wieder verschwindet, während sie im Serum, besonders in den höheren Konzentrationen sich mehr oder minder deutlich erhält. Wenngleich dieser Stamm in seinen kulturellen Eigenschaften (Alkalisierung von Lackmus-



molke und Milch, negative Indol-, positive Proteinochromreaktion, starke H<sub>2</sub>S-Entwicklung) zum Teil mit den Paratyphus-B- und Gärtner-Bakterien übereinstimmt, so ist es nach dem Ausfall der Agglutinationsprobe doch unmöglich, ihn der einen oder der anderen Species zuzurechnen. Zudem unterscheidet er sich auch durch seine kokkenartige Form, seine Unbeweglichkeit, durch die schwache Gasbildung aus Traubenzucker und die ziemlich kräftige Vergasung des Glyzerins vom Typus der Enteritisbakterien. Eine mit dem Stamm 98 übereinstimmende Bakterienkultur wurde von einem von uns (Horn) einmal aus der Muskulatur einer notgeschlachteten Kuh isoliert.

An den für die übrigen Stämme angeführten Agglutinationsbefunden fällt eine große Ungleichmäßigkeit auf, auf die auch bei den vorhergehenden Untersuchungsergebnissen mehrfach hingewiesen werden konnte. Wir haben es demnach bei den 12 Rinderstämmen zweifellos mit verschiedenartigen Bakterien zu tun. Bei dem von uns gebrauchten Beobachtungsverfahren konnte zwar bei allen Stämmen eine gewisse Beeinflussung durch die meisten Sera festgestellt werden, doch hielt sich diese bei RdSt 51, 55, 70, 71, 90 und 97 innerhalb der gewöhnlichen Grenzen der Mitagglutination (1:50—1:300). Bei RdSt 28, 84 und 89, die noch in den Verdünnungen 1:400, 1:500 und 1:600 von Paratyphus-B- bzw. Enteritidis-Gärtner-Serum agglutiniert wurden, könnte schon eher an spezifische Agglutination gedacht werden, und vor allem ist dies der Fall bei RdSt 29 und 69, bei denen Agglutination noch in den Verdünnungen 1:3000 und 1:2000 eintrat. Daß auch diese Stämme keine echten Vertreter der Enteritisgruppen sind, lehrten uns Kontrollagglutinationen in normalen Tierseris und in physiologischer Kochsalzlösung, sowie der Vergleich mit echten Paratyphus-B- und Gärtner-Bakterien. Bei Stamm 28 und 29 verliert die Agglutination schon dadurch ihre Spezifität, daß sie in annähernd gleicher Stärke in Paratyphus-B- und Enteritidis-Gärtner-Serum eintritt. Bei allen 5 Stämmen, auch bei dem nur durch Paratyphus-B-Serum agglutinierbaren RdSt 69, bleibt der Agglutinationswert weit hinter dem Endtiter der Sera zurück, und damit unterscheiden sich alle Rinderstämmen wesentlich von echten Enteritisbakterien.

Kutscher und Meinicke (37) haben zahlreiche Paratyphus-B-Kulturen aus den verschiedensten Gegenden untersucht. Sie haben gefunden, daß sich Paratyphusbacillen vom Typus B gegen homologe Sera außerordentlich gleichartig verhalten und nur geringe individuelle Unterschiede in der Agglutination zeigen. Fast alle ihre Stämme agglutinierten bis zur Titergrenze. „Wie kaum bei einer anderen Bakterienart verläuft bei den echten Paratyphusbacillen die Reaktion (Agglutination) durchaus regelmäßig. Es gibt weder schwer agglutinable, noch spielt die Gruppenagglutination eine Rolle (Kolle)“. Für die Paratyphus-B-Bakterien können wir auf Grund unserer Untersuchungen die Erfahrungen Kutschers und Meinickes bestätigen. Gewisse Unterschiede konnten wir dagegen bei der wechselseitigen Agglutination von Paratyphus-B- und Suipestifer-Bakterien mit den heterologen Seris feststellen: Unsere Paratyphus-B-Stämme wurden nur niedrig von Suiferin, unsere Suipestifer-Stämme verhältnismäßig schwach von Paratyphus-B-Serum „Kolle“ agglutiniert. Aber trotz dieser Unterschiede ist es möglich, besonders mit Hilfe des alle echten Bakterien der Hogcholera-Gruppe gleichartig beeinflussenden polyvalenten Paratyphus-B-Serums, die Rinderstämmen, insbesondere auch RdSt 69, auf Grund ihrer geringeren Agglu-

tinabilität von Paratyphus-B- und Suipestifer-Bakterien abzutrennen. Uebrigens beobachtete Andrejew (1) eine gleich schwache Agglutination seiner 12 aus Hammeldärmen gewonnenen Stämme, die sich wie *Bac. paratyphi* B, bzw. wie *Bac. enter.* Gärtner verhielten, ebenso Schmidt (54) an Stämmen aus Schweinedärmen, deren Titer sich auch bei hochwertigen Paratyphus-B-Seris in niedrigen Grenzen hielten.

#### Normalsera, physiologische Kochsalzlösung.

Bei den Untersuchungen Hubers hatte es sich gezeigt, daß seine aus Pferdefaeces gezüchteten Paratyphus-B-ähnlichen Bakterien von Pferdenormalseris verhältnismäßig hoch (1:150—600) agglutiniert wurden. Huber konnte diese Eigenschaft zur Differenzierung der Pferdestämme von den Bakterien der Hogcholeragruppe benutzen, da echte Paratyphus-B- und Schweinepestbakterien von denselben Seris nicht oder in geringerem Grade als die Pferdestämme beeinflußt wurden. Clinstock (18) gelang es, Schweinepestbacillen durch normales Schweineserum 1:250 zu agglutinieren, weshalb dieser Autor eine Reaktion von weniger als 300 diagnostisch für wertlos hält. Mit Rinderserum erzielte Rissling (50) etwas niedrigere Werte, gegenüber *Bact. coli* und *typhi* 1:40, mit *Bac. suipestifer* 1:100. Im übrigen agglutinierte normales Rinderserum aber alle von ihm geprüften Bakterien. Streng (61) agglutinierte mit normalem Rinderserum eine Reihe Mikroorganismen und fand, daß z. B. Typhusbacillen im frischen wie im inaktivierten Serum ausgeflockt, Tuberkelbacillen dagegen nur von frischem Serum beeinflußt wurden. Streng folgert hieraus, daß es sich bei dieser Ausflockung nicht um Agglutination, sondern um einen Vorgang handelt, den er mit Konglutination bezeichnet, und bei dem eine Alexinwirkung notwendig ist. Ein bei 56° C inaktiv gewordenes Rinderserum, das sein Alexin verloren hatte und keine Agglutination zeigte, konnte von Streng (61) durch Zusatz eines nicht agglutinierenden, frischen, Alexin enthaltenden Serums einer anderen Tierart wieder wirksam gemacht werden. Im Gegensatz zu Streng glaubt Spät (60), daß die nach dem Zusatz von normalem Rinderserum in Bakterienemulsionen auftretende Ausflockung nur als Agglutination aufgefaßt werden kann.

Nach diesen Erfahrungen erschien es uns wünschenswert zu untersuchen, inwieweit die gefundenen Paratyphus-B-ähnlichen Bakterien des Rinderdarmes durch Normalsera beeinflußt werden. Neben Normalseris vom Pferde und Kaninchen, die zur Kontrolle der spezifischen Agglutination Verwendung finden mußten, haben wir mit Rücksicht auf die Herkunft unserer Bakterien auch normale Rindersera geprüft. Bei den Stämmen 28, 29, 69, 84 und 89 wurden je 4 solcher Sera, bei allen übrigen Stämmen nur je eins zur Agglutination herangezogen. Die folgende Tabelle gibt über die nach 2 und 6 Stunden festgestellten Befunde näheren Aufschluß.

Vergleicht man zunächst die Einwirkung der verschiedenen Normalsera auf die einzelnen Stämme, so zeigt es sich, daß die Kaninchensera dieselben weit weniger beeinflussen als die Pferde- und Rindersera. Nur das Kaninchenserum 3 scheint für die meisten Stämme eine etwas höhere Agglutinationskraft zu besitzen als die anderen Kaninchensera. Dasselbe gilt auch für das Pferdeserum 2 im Vergleich zu den übrigen Pferdeseris. Die Sera verschiedener Individuen derselben Tierart weisen also in ihrem Gehalt an Normalagglutininen erhebliche Verschiedenheiten auf. Die für RdSt 29 angegebenen Grenzwerte haben nur beschränkte

RdSt No.	Normales Pferdeserum				Normales	
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 1	No. 2
28	100, 150	300, 400	50, 100	150, 200	150, 300	100, 200
29	1600, 3200	5000, 8000	3200, 4800	8000, 10000	2400, 4000	2400, 3000
51	100, 200	—	—	—	400, 1000	—
55	50, 100	—	—	—	50, 100	—
69	300, 400	400, 1200	200, 400	150, 400	400, 600	100, 200
70	50, 100	—	—	—	50, 100	—
71	200, 300	—	—	—	200, 300	—
84	300, 600	400, 600	100, 200	150, 300	400, 600	100, 200
89	150, 200	200, 400	50, 100	100, 200	400, 800	200, 300
90	100, 200	—	—	—	300, 400	—
97	50, 150	—	—	—	200, 400	—
98	+	+	+	+	+	+

Gültigkeit, weil dieser Stamm, ähnlich wie RdSt 98, in physiologischer Kochsalzlösung sehr häufig Spontanagglutination aufwies. Dieser Umstand erklärt auch die Höhe der durch spezifische Sera erhaltenen Agglutinationswerte. Einigemal konnte auch bei RdSt 69 in physiologischer Kochsalzlösung Ausflockung beobachtet werden.

Wenn wir den RdSt 29 außer Betracht lassen und die bei RdSt 28, 69, 84 und 89 durch Agglutination mit den Immunseris erhaltenen Werte mit den bei der Agglutination mit normalem Pferde- und Kaninchen-serum erzielten vergleichen, so ergibt sich, daß man höchstens bei RdSt 28 und 89 an spezifische Agglutination denken könnte. RdSt 28 wird durch Paratyphus-B- und Enteritidis Gärtner-Serum vom Kaninchen bis zur Verdünnung 1:400, von 4 normalen Kaninchen-seris bis höchstens 1:100 agglutiniert RdSt 89 wird von Enteritidis Gärtner-Serum vom Kaninchen bis 1:600, von 4 Normalseris von Kaninchen nur bis 1:200 beeinflusst. Der Umstand, daß bei beiden Stämmen der Grenzwert der Agglutination weit hinter dem Endtiter des Serums zurückbleibt, läßt die Spezifität dieser Reaktion allerdings im hohen Grade zweifelhaft erscheinen.

Agglutinierende Immunsera, hergestellt mit den RdSt 29, 69 und 71.

Um die verwandtschaftlichen Verhältnisse der RdSt unter sich und ihre Beziehungen zu den echten Enteritidbakterien des näheren zu

Rinder- Stämme No.	Serum RdSt 29 vom Kaninchen Titer 1:10 —16 000	Serum RdSt 69 vom Kaninchen Titer 1:8 —12 000	Serum RdSt 71 vom Kaninchen Titer 1:8 —12 000	Enteritis- stämme	Serum RdSt 29 vom Kaninchen Titer 1:10 —16 000	Serum RdSt 69 vom Kaninchen Titer 1:8 —12 000	Serum RdSt 71 vom Kaninchen Titer 1:8 —12 000
28	—, 50	—, 50	—, 50	PB Kettenhofer	50, 50	—, 50	50, 50
29	12000, 16000	50, 100	100, 150	PB Sambaß	—, 50	—, 50	—, 50
51	—, 50	50, 100	—, 50	PB Frau Müller	—, 50	—, 50	—, 50
55	—, 100	—, 50	—, —	PB Neunkirchen	—, 50	50, 75	50, 100
69	50, 100	8000, 12000	50, 200	PB Mirus	—, 50	—, 50	—, 50
70	—, —	—, 50	—, 50	PB Clauß	50, 50	50, 75	50, 100
71	—, 100	50, 100	8000, 12000	SP Wassermann	—, 50	—, 50	—, —
84	—, 50	200, 300	—, 50	SP Ostertag	—, —	—, 50	—, 50
89	50, 100	8000, 16000	—, 50	SP Höchst	—, 50	—, —	—, 50
90	—, —	—, —	8000, 12000	PB Kuh 100	—, 50	—, 50	100, 150
97	—, —	—, —	—, —	Stamm Kalb	50, 100	50, 75	50, 100
98	+	+	+	Ent. Gärtner	—, 50	—, 50	—, 50

Rinderserum		Normales Kaninchenserum				NaCl
No. 3	No. 4	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	
200, 400	200, 400	50, 100	0, 0	0, 50	0, 0	0
6400, 8000	1200, 4000	800, 1500	50, 150	400, 1200	400, 1200	+ (0)
—	—	100, 200	—	—	—	0
—	—	50, 100	—	—	—	0
400, 800	200, 300	50, 50	100, 150	1200, 3000	100, 150	0 (+)
—	—	0, 0	—	—	—	0
—	—	0, 50	—	—	—	0
100, 200	200, 300	100, 200	50, 100	200, 300	0, 50	0
100, 200	200, 400	50, 100	0, 50	100, 200	50, 50	0
—	—	0, 50	—	—	—	0
—	—	0, 50	—	—	—	0
+	+	+	+	+	+	+

studieren, wurden von 3 verschiedenen dieser Stämme, nämlich den Stämmen 29 (unbeweglich, Indol bildend), 69 (beweglich, Indol bildend) und 71 (unbeweglich, nicht Indol bildend) Immunsera hergestellt. Die Immunisierung geschah durch intravenöse Injektion bei 60° C abgetöteter und zuletzt durch subkutane Applikation lebender Kulturen.

Die erste Zahl gibt die Agglutination nach 2 Stunden, die zweite die nach 6 Stunden an. PB Kuh 100 ist ein Paratyphus-B-Stamm gezüchtet aus der Milz einer Kuh und Stamm Kalb ist ein aus der Milz eines Kalbes isolierter Stamm, der mit Enteritidis Gärtner-Serum bis zur Titergrenze agglutiniert wird.

Aus voriger Tabelle ergibt sich zunächst, daß kein Rinderstamm mit RdSt 29 identisch ist. Dagegen scheinen die RdSt 69 und 89 serologisch nahe verwandt zu sein, was um so merkwürdiger ist, als sie sich in mehreren kulturellen Eigenschaften und besonders auch in betreff der Beweglichkeit und der Agglutinabilität durch Paratyphus-B-Sera voneinander unterscheiden. Weiter kann nach dem Ergebnis der Agglutination als feststehend die Identität der auch in allen Kultureigentümlichkeiten übereinstimmenden Stämme 71 und 90 angesehen werden.

Die Agglutinationsversuche mit den Seris der RdSt 29, 69 und 71 haben demnach ergeben, daß zwischen der Mehrzahl der RdSt keine serologische Verwandtschaft besteht. Es gibt unter den RdSt verschiedene Rassen. Eine genaue Festlegung der serologischen Beziehungen aller Stämme wäre nur möglich gewesen, wenn mit jedem einzelnen Stamm ein Immunserum hergestellt worden wäre.

Interessant ist auch die in der Tabelle hervortretende sehr geringe Beeinflussung der Paratyphus-B-, Suipestifer- und Enteritidis-Gärtner-Stämme durch die verschiedenen Rinderimmunsera. Die Sera RdSt 29 und 69 agglutinieren überhaupt keinen Stamm über 1:75, mit alleiniger Ausnahme des Kälberstammes, der noch in einer Verdünnung 1:100 nach 6 Stunden zusammengeballt wird. Auch das hochwertige Immunserum RdSt 71 ist nicht imstande, eine Agglutination zu erzeugen, die als spezifisch angesehen werden könnte.

Die Feststellung, daß in den Seris der RdSt Agglutinine für Paratyphus-B-Bakterien fehlen, ist besonders für das Serum des von Paratyphus-B-Seris verhältnismäßig hoch agglutinierten Stammes 69 von großer Wichtigkeit. Es ergibt sich daraus die völlige Verschiedenheit dieses Stammes von echten Paratyphus-B-Bakterien.

### Absorptionsversuche.

Zur Feststellung der serologischen Beziehungen zwischen RdSt und Paratyphus-B- und Gärtner-Bakterien wurden einige Absorptionsversuche vorgenommen. Dabei wurde die folgende Methode eingehalten:

Fünf gut bewachsene breite 24-stündige Schrägagarkulturen der betreffenden Bakterien wurden mit 10 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und mit der gleichen Menge einer Verdünnung 1:50 des in Betracht kommenden Serums unter kräftigem Schütteln vermischt. Nach ca. 20-stündiger Aufbewahrung bei 20° C wurde die Bakterienemulsion bis zur Klärung scharf zentrifugiert. Dieses nach einmaliger Absättigung gewonnene Serum stand demnach in einer Verdünnung 1:100 zur Verfügung.

1) Polyvalentes Paratyphus-B-Serum vom Kaninchen wurde mit Stamm 28 abgesättigt. Dieser RdSt 28 wird von diesem Serum in der Verdünnung 1:100 innerhalb 4 Stunden nicht agglutiniert. Dagegen werden 4 Menschen-Paratyphus-B-Stämme (Sambaß, Saarbrücken, Clauß, Frau Müller) sofort 1:6000–8000 agglutiniert. Das abgesättigte Serum agglutiniert demnach ebenso hoch wie das nicht-abgesättigte.

2) Enteritidis-Gärtner-Serum „I. f. I.“, abgesättigt mit RdSt 28. RdSt 28 wird nach 6 Stunden nicht, der Enteritidis-Gärtner-Stamm schon in 1/2 Stunde bis zur Titergrenze agglutiniert.

3) Polyvalentes Paratyphus-B-Serum, abgesättigt mit RdSt 69. Letzterer wird vom Serum 1:100 feinkörnig zusammengeballt; das gleiche Phänomen tritt jedoch auch in gleich schwacher Weise in physiologischer Kochsalzlösung ein. Die Paratyphus-B-Stämme Mirus, Sambaß, Saarbrücken, Clauß werden vom abgesättigten Serum sofort bis 1:8000 agglutiniert.

4) Paratyphus-B-Serum „Kolle“, abgesättigt mit RdSt 84. Innerhalb 6 Stunden wird dieser Stamm durch das gewonnene Serum nicht beeinflusst. Dagegen agglutinieren 4 Paratyphus-B-Stämme (Frau Müller, Clauß, Saarbrücken, Mirus) sofort 1:8–10 000.

5) Polyvalentes Paratyphus-B-Serum, abgesättigt mit RdSt 89, verhält sich übereinstimmend wie RdSt 69. Auch RdSt 89 neigt zur Agglutination in physiologischer Kochsalzlösung, und es tritt demnach im abgesättigten Serum eine schwache, feinkörnige Ausflockung ein (1:100). Die Paratyphus-B-Stämme Mirus, Sambaß, Saarbrücken werden sofort in einer Verdünnung von 1:6–8000 agglutiniert.

6) Enteritidis-Gärtner-Serum „I. f. I.“, abgesättigt mit RdSt 89. RdSt 89 wird in 6 Stunden 1:100 nicht agglutiniert, der Enteritidis Gärtner-Stamm sofort 1:4000.

7, 8 und 9) Enteritidis-Gärtner-Serum vom Kaninchen, abgesättigt mit den RdSt 51, 55 und 97. RdSt 51 wird durch das abgesättigte Serum 1:100 schwach ausgeflockt, ebenso in physiologischer Kochsalzlösung. RdSt 55 und 97 zeigen in Serum 1:100 nach 6 Stunden keine Agglutination. Enteritidis Gärtner wird bis zur Titergrenze agglutiniert.

Der Ausfall dieser Absorptionsversuche beweist in Uebereinstimmung mit den angeführten Agglutinationsversuchen, daß die RdSt, auch die von Paratyphus-B- und Enteritidis Gärtner-Sera in gewisser Höhe agglutinierten Stämme 28, 69, 84 und 89, nicht zu den Enteritisbakterien gerechnet werden dürfen. Die Sera von Paratyphus-B- oder Enteritidis Gärtner-Bakterien enthalten agglutinogene Gruppen, die diese Paratyphus-B-ähnlichen Bakterien des Rinderdarmes in geringem Maße beeinflussen; dagegen enthalten die Sera der RdSt für Enteritisbakterien keine Rezeptoren. Die Agglutination der RdSt durch Paratyphus-B- und Enteritidis-Gärtner-Sera ist also, soweit man nicht Normalagglutinine dafür verantwortlich machen kann, als Mitagglutination aufzufassen.

### Vergleichsagglutination.

Wir hielten es für angebracht, die von uns isolierten RdSt mit den Huberschen Pferdestämmen in ihrem serologischen Verhalten zu ver-

gleichen, da die kulturelle Untersuchung für einige der Stämme eine mehr oder weniger weitgehende Uebereinstimmung ergeben hatte. Auch ein aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt stammender Paratyphus-C-Stamm, der uns von Herrn Privatdozent Dr. P. Schmidt überlassen wurde, zogen wir zu diesen Untersuchungen heran. Die Ergebnisse der ausgeführten Agglutinationen sind in der folgenden Tabelle mitgeteilt.

RdSt	Serum PfSt 2 vom Kaninchen Titer 1:4000 bis 6000	Serum PfSt 10 a vom Kaninchen Titer 1:3000 bis 5000	Serum PfSt 21 vom Kaninchen Titer 1:20000	Serum PfSt 23 a vom Kaninchen Titer 1:8000 bis 12000	Serum PfSt 34 b vom Kaninchen Titer 1:8000 bis 12000	Paratyphus C-Serum vom Kaninchen Titer 1:2000
28	50, 50	50, 50	50, 50	400, 600	50, 100	—, —
29	200, 600	50, 400	100, 300	200, 400	200, 300	—, 50
51	50, 100	—, 50	50, 50	50, 50	—, 50	—, —
55	50, 100	—, 50	—, 50	—, 50	—, 50	—, —
69	12 000, 16 000	150, 250	12 000, 16 000	6000, 8000	12 000, 16 000	50, 50
70	—, —	—, —	—, 50	—, —	—, —	—, —
71	150, 400	—, 50	—, 50	150, 300	200, 400	—, 50
84	50, 100	—, 50	50, 100	50, 100	50, 150	200, 300
89	8000, 12 000	100, 150	16 000, 20 000	5000, 8000	6000, 8000	—, 50
90	100, 150	—, —	—, —	150, 200	100, 200	—, 50
97	—, —	—, —	—, —	—, —	—, —	—, —
98	+	+	+	+	+	+

Die erste Zahl gibt die Agglutination nach 2 Stunden, die zweite die nach 6 Stunden an.

Aus dieser Tabelle geht mit Sicherheit hervor, daß die RdSt 69 und 89 von den Seris der beweglichen PfSt 2, 21, 23 und 34 spezifisch beeinflußt werden. RdSt 69, der auch in allen kulturellen Eigenschaften (mit alleiniger Ausnahme der Schwefelstoffwasserentwicklung) mit den Pferdestämmen übereinstimmt, kann auf Grund dieser Agglutination als mit den PfSt identisch betrachtet werden, um so mehr, als auch das Serum dieses Stammes die PfSt 2, 21, 23 und 34 bis zur Titergrenze agglutiniert. Die hohe Agglutination des unbeweglichen, von Paratyphus-B-Serum nicht beeinflussten Stamm 89, der sich auch durch das Unvermögen, Schwefelwasserstoff zu entwickeln und Glyzerin zu vergären, von den PfSt und dem RdSt 69 unterscheidet, ist, wie schon früher hervorgehoben wurde, eine höchst auffallende Erscheinung. Aus der Tabelle ist ferner zu ersehen, daß keiner unserer Paratyphus-B-ähnlichen Bakterien des Rinderdarmes mit dem Uhlenhuthschen Paratyphus-C-Bacillus serologisch verwandt ist. Erwähnt sei schließlich noch, daß eine Agglutination der PfSt durch die Sera der RdSt 29 und 71 durchweg negative Resultate lieferte.

#### Schlußbetrachtung über die Paratyphus-B-ähnlichen Bakterien des Rinderdarmes.

Wir haben gesehen, daß im Darms gesunder, erwachsener Rinder Bakterien vorkommen, die in manchen Eigenschaften mit dem Bact. paratyphi B übereinstimmen und, bei oberflächlicher Untersuchung, mit diesem verwechselt werden können. Eine solche Verwechslung wird insbesondere eintreten können, wenn nicht alle morphologischen, biologischen und serologischen Verhältnisse berücksichtigt und vergleichende Untersuchungen unterlassen werden.

Alle diese im Darms von gesunden Rindern vorkommenden Bakterienstämme unterscheiden sich, wie eine eingehende Untersuchung er-



gibt, von den Hogcholera- und Enteritidis-Gärtner-Bakterien. Die meisten der Paratyphus-B-ähnlichen Bakterien des Rinderdarmes können schon auf Grund der fehlenden Agglutination von den Enteritidisbakterien abgetrennt werden. Für die untereinander verschiedenartigen, durch Paratyphus-B- und Enteritidis-Gärtner-Sera mehr oder weniger beeinflussten RdSt 28, 29, 69, 84 und 89 seien die unterscheidenden Merkmale im folgenden einzeln angegeben.

RdSt 28: Negative Schwefelwasserstoff- und Proteinochrom-, positive Indolreaktion; sehr niedere Agglutination durch Paratyphus-B- und Enteritidis-Gärtner-Serum vom Kaninchen (400); ebenso hohe Agglutination durch normale Pferde- und Rindersera; Unvermögen, dem Paratyphus-B- und Enteritidis-Gärtner-Serum nachweisbare Agglutininmengen zu entziehen.

RdSt 29: Fehlende Eigenbewegung; Gasbildung in Glycerinnährböden; negative Schwefelwasserstoff- und Proteinochrom-, positive Indolreaktion; mittelhohe Agglutination in gleicher Weise durch normale und spezifische Sera; Spontanagglutination in physiologischer Kochsalzlösung.

RdSt 69: Schwache Gasbildung in Glycerinnährböden; positive Indol-, negative Proteinochromreaktion; schwache Agglutination durch Paratyphus-B-Sera (2000); annähernd ebenso hohe Agglutination in normalen Pferde-, Rinder- und Kaninchenuseris (diese letzte Erscheinung ist wohl auf die zuweilen beobachtete Spontanagglutination zurückzuführen); fehlende Agglutination echter Paratyphus-B-Bakterien durch ein mit RdSt 69 hergestelltes Serum; Unvermögen, in einem Paratyphus-B-Serum nachweisbare Agglutininmenge zu absorbieren.

RdSt 84: Gasbildung in Glycerinnährböden; positive Indol-, negative Proteinochromreaktion; sehr schwache Agglutination durch ein Paratyphus-B-Serum vom Pferd (500); ebenso hohe Agglutination durch normales Pferde- und Rinderserum; Unvermögen, einem Paratyphus-B-Serum nachweisbare Agglutinationsmengen zu entziehen.

RdSt 89: Fehlende Eigenbewegung; fehlende Schwefelwasserstoff- und Proteinochrom-, positive Indolreaktion; schwache Agglutination durch Enteritidis-Gärtner-Serum vom Kaninchen (600); ebenso hohe Agglutination durch normales Rinderserum; Unvermögen, dem Paratyphus-B- und Enteritidis-Gärtner-Serum nachweisbare Agglutininmengen zu entziehen.

Die Paratyphus-B-ähnlichen Bakterien des Pferdedarmes ließen sich nach Huber's Untersuchungen von echten Paratyphus-B-Bakterien durch folgende Merkmale unterscheiden:

Kräftige Gasbildung aus Glycerin; geringeres Reduktionsvermögen gegenüber Farbstoffen; geringere Schwefelwasserstoffentwicklung; negative Proteinochrom- und positive Indolreaktion; verhältnismäßig geringe Agglutination durch spezifische Sera; keine oder geringgradige Beeinflussung echter Paratyphus-B-Bakterien durch die Sera der PfSt; stärkere Agglutination durch normale Pferdesera.

Die meisten dieser Unterscheidungsmerkmale treffen, wie die obige Aufzählung zeigt, auch für die agglutinablen Rinderstämme zu, jedoch bei diesen unter sich heterologen Stämmen nicht mit solcher Gleichmäßigkeit, wie bei den einer Rasse angehörigen Pferdestämmen. Bei allen Stämmen konnte auf die relativ niedrige, hinter dem Endtiter der Sera weit zurückbleibende Agglutination hingewiesen werden. Bei dem mit den PfSt identischen RdSt 69 konnte auch gezeigt werden, daß ein mit diesem Stamm hergestelltes Serum echte Paratyphus-B-Keime nicht agglutiniert. Interessant ist sodann bei den 5 durch Paratyphus-B- bzw. Enteritidis-Gärtner-Sera beeinflussten Stämmen der negative Ausfall der Proteinochrom- und der positive Ausfall der Indolreaktion, während fast alle nicht agglutinablen Stämme in dieser Hinsicht sich wie typische Paratyphus-B-Bakterien verhielten. Echte Paratyphus-B- und Enteritidis-Gärtner-Bakterien bilden kein Indol, wie durch mehrfache Untersuchungen dargetan wurde [cf. unter anderem Telle und Huber (62)]. Dagegen zeigen nach unseren Befunden unter den im Darminhalt von Rindern vorkommenden Paratyphus-

B-ähnlichen Bakterien gerade die durch spezifische Sera mehr oder weniger beeinflussten Stämmen ausgesprochene Indolbildung. Die Indolreaktion ist also ein wichtiges diagnostisches Hilfsmittel, um echte Bakterien der Hogcholera- und Gärtner-Gruppe von Pseudoenteritisbakterien abzutrennen. Ein durch Paratyphus-B- und Hogcholerasera beeinflusstes Bakterium ist durch eine positive Indolreaktion in verhältnismäßig kurzer Zeit als nicht echt zu erkennen.

Wir möchten unsere Rinderstämme am liebsten mit dem Namen Paracolibakterien belegen, um damit anzudeuten, daß sie jener großen Gruppe der verschiedenartigsten Varietäten des *Bact. coli commune* zuzurechnen sind, die neben den typischen Coli-Bakterien in der Darmflora zahlreicher Tiere einen breiten Raum einnehmen. Sie stehen ihren kulturellen und biologischen Eigenschaften nach zwischen dem *Bact. paratyphi B* und dem *Bact. coli commune*. Als Paratyphus-B-ähnlich kann man insbesondere jene Stämme bezeichnen, die, wie vor allem RdSt 69, durch Paratyphus-B-Sera zweifellos beeinflusst werden.

Es ist von großem Interesse, daß auch im Darminhalt anderer Tiere solche Paratyphus-B-ähnliche Bakterien festgestellt wurden. Als erster hat Andrejew (1) bei Schafen diese Beobachtung gemacht, sodann Huber (26) bei Pferden und schließlich Schmidt (54) und seine Mitarbeiter bei Schweinen. Alle diese Autoren fanden im Darminhalt der von ihnen untersuchten Tiere keine echten Paratyphus-B-Bakterien, sondern kulturell Paratyphus-B-ähnliche, die durch spezifische Sera wenig oder gar nicht beeinflusst wurden. Die von Schmidt und seinen Mitarbeitern bei Schweinen festgestellten Verhältnisse zeigen die größte Übereinstimmung mit den von uns bei Rindern gemachten Beobachtungen. Schmidt fand, wie wir, mehr nicht-agglutinable „Paratyphus-B“-Stämme als solche, die von Paratyphus-B-Seris beeinflusst wurden. Sera, die mit zwei agglutinablen Stämmen hergestellt waren, vermochten 20 echte Paratyphus-B-Stämme nicht zu fällen.  $\frac{2}{3}$  der Schmidtschen Stämme, auch der agglutinablen, bilden Indol. Schmidt kommt, wie Huber und wir, auf Grund seiner Untersuchungen zu dem Schlusse, daß es sich bei diesen im Darminhalte gesunder Tiere vorkommenden Bakterien nicht um echte Paratyphus-B-Keime handelt, sondern um Varietäten, die wohl nur selten pathogen sind.

Diese an einem großen Materiale erhaltenen Untersuchungsergebnisse Schmidts stehen in erheblichem Gegensatz zu den Resultaten der bekannten Arbeiten von Uhlenhuth, Hübener, Xylander und Bohtz (67, 68). Wir möchten uns über die Verbreitung von Paratyphus-B-Bakterien bei Schweinen kein Urteil erlauben. Bei Rindern aber scheint es uns erwiesen zu sein, daß keine echten Paratyphusbakterien vorkommen. Titze und Weichel (63), Aumann (4) und wir haben keine Paratyphus-B-Bakterien im Darminhalt von Rindern gefunden. Nur Morgan (41) und Eckert (13) geben an, positive Befunde gemacht zu haben. Die Arbeit von Morgan ist uns leider im Original nicht zugänglich. Die Eckertschen Angaben halten einer Kritik nicht stand. Eckert sprach seinen Rinderstamm als *Bact. paratyphi B* an auf Grund einer Agglutination bis zur Verdünnung 1:500 durch ein hochwertiges Serum mit dem Titer 1:7000. Ähnliche niedrige Agglutinationswerte (200, 300, 500, 1000) ergaben auch seine aus Schweinekot isolierten „Paratyphus-B“-Stämme mit diesem Serum. Eine Agglutination typischer Paratyphus-B-Keime durch das Serum einer

dieser Stämme hat Eckert nicht vorgenommen, auch hat er auf Bildung von Indol und Proteinochrom nicht geprüft. Es kann nach alledem kaum angenommen werden, daß die Eckertschen Stämme mit Sicherheit echte Paratyphus-B-Bakterien waren.

Das Fehlen von Paratyphus-B-Bakterien im Darminhalt gesunder Rinder steht im Einklang mit den seltenen Befunden solcher Keime in den Organen kranker Tiere. So ist es uns bei ca. 500 Untersuchungen notgeschlachteter Tiere nur dreimal gelungen, sogenannte Fleischvergifter nachzuweisen, ein Befund, wie er von den verschiedensten Seiten und an verschiedenen Oertlichkeiten ebenfalls erhoben wurde.

Die Frage der Ubiquität der Paratyphus-B-Bakterien ist nicht als abgeschlossen zu betrachten. Es scheint uns, daß es mit der weiten Verbreitung dieser Keime in der Außenwelt, wie sie vermutet und behauptet worden ist, recht zweifelhaft bestellt ist, und wir möchten uns bis zu einem gewissen Grade König (32) anschließen, der es durchaus noch nicht als erwiesen ansieht, daß der Paratyphus-B-Bacillus in größerer Verbreitung als nicht-pathogener Keim in der Außenwelt vorkommt, es sei denn, daß man, worauf Aumann (3) hinweist, mit verschiedener geographischer Verbreitung zu rechnen hat.

## **II. Rinderstämme, die sich wie die unter No. I verhalten, aus Traubenzucker aber kein Gas bilden.**

Diese Stämme kommen sowohl im Dünndarm als auch im Dick- und Mastdarm vor. Sie verhalten sich, wie gleich vorausgeschickt sein mag, abgesehen von der Beweglichkeit, morphologisch und biologisch viel gleichmäßiger als die sogenannten Paratyphus-B-ähnlichen Bakterien. Sie scheinen demnach untereinander näher verwandt zu sein. Die Beweglichkeit können wir ebenso wie die Begeißelung als ein unwesentliches Merkmal beiseite lassen, da erfahrungsgemäß die Begeißelung von Momenten abhängig ist, die wir nicht immer kennen. Im übrigen verhalten sich diese Stämme ähnlich dem Stamm V, den Uhlenhuth und seine Mitarbeiter (67, 68) aus dem Darne gesunder und kranker Schweine züchten konnte und einem Bakterienstamme, der von Dorset (67, 68) in der Milz eines hogcholerakranken Schweines gefunden wurde.

Bei unseren Untersuchungen handelt es sich um folgende Stämme: RdSt 30, 52b, 54, 68, 76b, 92, 96. Es sind sämtlich gramnegative plumpe Stäbchen, von denen Stämme 30, 52, 68, 76 in Traubenzuckerbouillon und Agarkondenswasser als unbeweglich, Stämme 54, 96 als langsam und Stamm 92 als lebhaft beweglich bezeichnet werden müssen. Gelatine wird von ihnen nicht verflüssigt, Milch nicht zum Gerinnen gebracht, dagegen ziemlich rasch gelb gefärbt. In Lackmusalbe tritt zunächst eine Säurebildung und Rotfärbung, nach 3—8 Tagen aber eine Blaufärbung ein. Als wesentlichstes Unterscheidungsmerkmal von den unter I genannten Bakterien ist ihr Verhalten in Traubenzuckernährböden anzusehen; Traubenzucker wie Milchzucker werden nicht verändert. Mit Ausnahme des Stammes 92, der sich auch sonst in mancher Hinsicht anders verhält und mit gewissen von Hüttemann (27) im Darm von Rindern gefundenen Bakterienstämmen identisch zu sein scheint, bilden sämtliche Bakterien kräftig Indol, aber, wie zu erwarten war, kein Proteinochrom. Die Schwefelwasserstoffbildung ist mäßig, aber deutlich — Stamm 92 ohne H<sub>2</sub>S-Entwicklung.

Glyzerin wird von diesen Bakterienarten wenig angegriffen, nach 4 Tagen ist noch keine Säurebildung zu beobachten — Stamm 92 bildet

Säure und wenig Gas —, etwas später tritt in den glyzerinhaltigen Nährböden Rötung, aber keine Gasentwicklung ein.

Obwohl wir in dem Verhalten gegenüber Traubenzucker und in der Indolbildung einen wesentlichen Unterschied gegenüber der Hogcholera-gruppe gefunden hatten, hielten wir es noch für angebracht, sämtliche Stämme mit polyvalentem Paratyphus-B-Serum, Suipestifer- und Normalrinderseum zu agglutinieren, da Joest (29) und Grabert (21) über Hogcholerasträmme berichten, die im Traubenzuckernährboden kein Gas bilden. Es zeigte sich nun bei diesen Agglutinationsversuchen, daß keines dieser Sera in einer Verdünnung 1:100 imstande war, einen dieser Stämme nach 6 Stunden zusammenzuballen, mit Ausnahme des Stammes 92, der durch normales Rinderseum noch 1:400 agglutiniert wurde, von den Paratyphus-B-Seris aber fast unbeeinflusst blieb.

Diese Traubenzucker nicht vergärenden Paratyphus-B-ähnlichen Stämme sind nach unseren Befunden in ca. 6 Proz. der untersuchten Rinder aufgefunden worden. Eine Verwechselung mit Bakterien der Hogcholera-gruppe ist durch ihr Verhalten in Traubenzucker, durch Indolbildung und ihre geringe Beeinflussung durch Paratyphus-B- oder Suipestifer-Serum leicht zu vermeiden.

### III. Paratyphus-A-ähnliche Bakterien.

Nach einer Arbeit von Schöne (56) beobachtete der Engländer Gwyn (22) einen Krankheitsfall, der im allgemeinen das Bild des Abdominaltyphus bot. Er fand dabei einen Bacillus, von ihm Para-Colon-bacillus genannt, der mit dem Typus A, des später unabhängig von Gwyn durch Schottmüller (57) entdeckten Paratyphusbacillus übereinstimmte. Dieser Typus A ist jedoch, wie sich bei der Durchsicht der Literatur herausstellte, verhältnismäßig selten als Krankheitserreger gefunden worden. Es war daher um so auffallender, daß hin und wieder im gesunden Tierkörper Funde von Bacillen bekannt wurden, die mit dem Paratyphus-A-Bacillus mehr oder weniger übereinstimmten. So berichtet Morgan (41) über einige Funde, die er bei seinen Untersuchungen von Faeces von Meerschweinchen, Kaninchen, Schafen, Schweinen bzw. an der Darmschleimhaut von Schweinen, Schafen, Ochsen, einem Pferde und einem Kalbe gemacht hatte. Er stellte 10mal, allerdings niemals beim erwachsenen Rinde, Bakterien fest, die mit dem Bacillus Paratyphus A morphologisch und biologisch übereinstimmten, durch Paratyphus-A-Serum aber nicht agglutiniert wurden. Uhlenhuth und seine Mitarbeiter (67, 68) hatten gelegentlich ihrer Untersuchungen über die Schweinepest neben sogenannten Varietäten des Bac. suipestifer auch Paratyphus-A-gleichende Bacillen gefunden, die mit dem spezifischen Serum agglutinierten. Bei ihren weiteren Untersuchungen stellten sie zwar ebenfalls in den Organen oder Därmen schweinepestkranker Ferkel Bacillen fest, die mit dem Bac. paratyphi A übereinstimmten, aber durch Paratyphus-A-Serum nicht agglutiniert wurden, also im allgemeinen den von Morgan (56) gefundenen Bacillen glichen. Endlich gelang es Schöne (56), aus dem Darme von 100 einwandfreien Schweinen durch Abschabungen von der Darmschleimhaut 20 Coli-Stämme zu isolieren, die durch Paratyphus-A-Serum agglutiniert wurden. Sie bildeten alle Indol, brachten Milch in 24 Stunden zur Gerinnung und zeigten alle Charakteristika des Coli-Bacillus, obschon sie Milchezucker nicht gleichmäßig schnell angriffen. In 50 Meerschweinchenfaeces fand Schöne ebenfalls drei durch Paratyphus-A-Serum agglutinierende

Coli-Stämme. Die Agglutinierbarkeit seiner Stämme reicht allerdings nicht bis zur Titergrenze seines Serums und, was noch besonders bemerkt sein mag, das aus einem Schweinestamme gewonnene Serum beeinflusst den *Bac. paratyphi A* nur sehr gering. Es ist eine analoge Erscheinung, wie wir sie mit den Sera paratyphus-B-ähnlicher Stämme gegenüber pathogenen Vertretern der Paratyphus-B-Gruppe beobachtet hatten. Im allgemeinen verhalten sich demnach die Schöneschen Stämme gerade umgekehrt wie die von Morgan isolierten.

Nach allen diesen Befunden lag es natürlich nahe, uns mit dem Vorkommen ähnlicher oder gleicher Stämme im Darm gesunder, erwachsener Rinder zu befassen. Es stellte sich dabei bald heraus, daß auch in den Faeces der Rinder Bakterien vorkommen, die mehr oder weniger mit dem *Bac. paratyphi A* übereinstimmen.

Es sind nun im folgenden nicht alle Stämme berücksichtigt, sondern nur 6 eingehender untersucht worden. Es handelt sich um RdSt 12, 15, 53β, 82, 87, 91. Es sind gramnegative Stäbchen, die keine ausgeprägte Ortsbewegung im hängenden Tropfen ausführen. Ueber weitere Eigenschaften gibt die folgende Tabelle Aufschluß.

RdSt No.	Gelatine	Lackmusmolke	Milch	Traubenzuckerbouillon	Milchzuckerbouillon	Indol	Proteinchrom	H <sub>2</sub> S	Glycerinbouillon nach 10 Tagen	Agglutination	
										Parat.-A-Serum 1:2000	Parat.-B-Serum 1:6-8000
12	nicht verflüssigend	dauernd rot	unverändert	Gasbildung	kein Gas	+	—	+	Säure + Gas	—, 100	—, 50
15	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	+	—	+	S. + G. —	—, 50	—, 50
53	"	"	"	"	"	+	—	+	S. + G. —	100, 150	—, 50
82	"	"	"	"	"	+	—	+	S. + G. Spur	—, 50	—, 50
87	"	"	"	"	"	+	—	+	S. + G. —	300, 400	100, 200
91	"	"	"	"	"	+	—	+	S. + G. +	—, 100	50, 100

Alle Stämme verhalten sich morphologisch und zum Teil auch biologisch fast gleichmäßig. Hinsichtlich ihres Verhaltens auf Gelatine-nährboden, in Lackmusmolke, Milch, Traubenzucker- und Milchzuckerbouillon verhalten sie sich wie *Bac. paratyphus A*. Stamm 53 und 87 werden außerdem durch Paratyphus-A-Serum schwach beeinflusst, Stamm 87 daneben auch noch durch polyvalentes Paratyphus-B-Serum, doch wird in keinem Falle der Titer des Serums auch nur annähernd erreicht. Auf Grund dieses Agglutinationsbefundes einerseits und der Indolbildung andererseits müssen wir jedoch diese Bakterienstämme vom Paratyphus A abtrennen und als eine besondere Gruppe ansehen. Wir haben durch die Untersuchungen Schönes (56) gesehen, daß auch Coli-Stämme aus gesunden Tieren gezüchtet, vom Paratyphus-A-Serum verhältnismäßig hoch beeinflusst werden können. Es ist auch bei den vorliegenden Rinderstämmen berechtigt, nur von einer Mitagglutination zu reden. Sie stimmen demnach vielfach mit den von Morgan im Darm von verschiedenen Tieren und bis zu einem gewissen Grade auch mit den von Uhlenhuth und seinen Mitarbeitern gefundenen Bakterienstämmen überein.

## VL Typhusähnliche Rinderstämme.

Einen nicht allzu seltenen Befund im Darms gesunder, erwachsener Rinder bilden eine gewisse Art von Bakterien, die in ihrem kulturellen Verhalten als typhusähnliche bezeichnet werden können. Sie zeigen, wie des weiteren noch erörtert werden soll, eine große Uebereinstimmung mit einer Bakteriengruppe, die Uhlenhuth und seine Mitarbeiter (68) aus Organen bzw. Darminhalt gesunder und schweinepestkranker Schweine züchten konnte. Beide Bakterienarten dürften miteinander identisch sein. Auch hier haben wir nicht alle Stämme berücksichtigt, sondern sind nur auf Stamm 11, 52 und 53 b näher eingegangen. Morphologisch verhalten sie sich wie echte Typhusstämmen, ihre Beweglichkeit, vor allem das Fortschlängeln, das für Typhusbacillen charakteristisch ist, haben wir nicht beobachten können. Andererseits wird Gelatine nicht verflüssigt, Lackmusmolke von ihnen dauernd gerötet, die Milch bleibt unverändert, auch wird aus Traubenzucker- sowohl wie aus Milchsuckerbouillon kein Gas gebildet. Indolbildung ist nicht beobachtet worden, dagegen war schwache Proteinchrombildung nachzuweisen. Geringe Schwefelwasserstoffentwicklung war zugegen; in Glycerinnährböden konnte weder Säure- noch Gasbildung festgestellt werden. Auf Grund dieses morphologischen und biologischen Verhaltens war die Bezeichnung typhusähnlich wohl berechtigt, und wir halten es für angezeigt, diese Stämme mit hochwertigem Kollischen Typhusserum 1:10000 zu agglutinieren. Diese Versuche fielen in allen Fällen negativ aus und zeigten damit eine gewisse Uebereinstimmung mit den Resultaten, die Uhlenhuth an seinen Stämmen erzielte. Hervorzuheben wäre noch, daß ihr Wachstum auf Agar, Gelatine und in Bouillon sehr spärlich war. Es bildete sich nur ein feiner, dünner Ueberzug auf Schrägagar, der aber nach einigen Generationen ausblieb. Selbst auf Blutserum war ein Absterben nicht zu verhindern. Daß diese Stämme durch Paratyphusserum Kolle und pol. Paratyphusserum ebensowenig wie durch Suiferin agglutiniert wurden, sei nur nebenbei erwähnt.

## V. Rinder-Faecalis-Stämme.

Als letzte Gruppe der gefundenen Bakterienstämme wurden noch die Faecalis-Stämme 16, 46 und 76 berücksichtigt, eine Bakterienart, die von Petruschky (45) in Faeces gefunden und näher beschrieben wurde. Petruschky fand sie mit einem Kranz von Geißeln ausgestattet, dem aber Kühnemann (36) widerspricht. Nach diesem Autor zeigt der *Bacillus alcaligenes* eine typische Begeißelung. Die Geißeln befinden sich stets an den Polen, nie an den Längsseiten, meist ist nur ein Pol, seltener beide Pole besetzt. Mitunter sind die Geißeln geteilt.

An unseren drei Stämmen haben wir mit Sicherheit nur an den Polen und fast regelmäßig nur an einem eine Begeißelung feststellen können. Neben der Löfflerschen Methode wurde auch die Geißelfärbung nach Peppler angewendet. Im übrigen zeigten unsere Rinder-Faecalis-Stämme auf Schrägagar nur ein mäßiges Wachstum, im hängenden Tropfen waren sie lebhaft beweglich, Gelatine verflüssigten sie nicht; Milch färbten sie rasch gelb, ohne jedoch eine Gerinnung herbeizuführen. Lackmusmolke wurde nach 2—4 Tagen tief blau gefärbt. Im Traubenzucker, sowohl wie in Milchsuckerbouillon, kam es nicht zur Gasentwicklung, ebenso verlief die Ehrlichsche Indolprobe bei sämtlichen drei Stämmen negativ. Proteinochrom wurde nur mäßig gebildet.



In Glycerinnährböden kam es weder zur Säure- noch Gasbildung. Die Schwefelwasserstoffbildung blieb mäßig.

Nach diesem Verhalten dürfte es sich bei den vorliegenden Stämmen um *Bacillus faecalis alcaligenes* handeln. Er kommt demnach im Rinderdarm verhältnismäßig selten vor (3 Proz.), und ist bereits von Hüttemann (27) im normalen Darmtraktus des Rindes gefunden worden. Seine Bedeutung ist zurzeit noch immer eine umstrittene Frage, obwohl ihm eine Pathogenität im allgemeinen abgesprochen wird. In der Tierpathologie liegen, soweit uns bekannt, keine Beobachtungen vor, dagegen scheint es nach einem Befunde Hamms (23) berechtigt zu sein, entgegen den bisherigen Anschauungen, die *Alcaligenes*-Gruppe zu zu den pathogenen Mikroorganismen des Menschen zu rechnen.

### Zusammenfassung.

1) Im Darminhalt gesunder Rinder kommen verhältnismäßig oft Bakterien vor, die morphologisch und kulturell (auf Agar, Gelatine, Milch, Lackmusmolke, Traubenzucker- und Milchzuckerbouillon) mit den Enteritidibakterien übereinstimmen. Diese Bakterien gehören verschiedenen Rassen an und sind untereinander nur zum Teil identisch.

2) Ein Teil dieser Bakterien zeigt eine gewisse Beeinflussung durch Paratyphus-B- bzw. Enteritidis-Gärtner-Sera, jedoch lassen exakte serologische Untersuchungen einwandfrei erkennen, daß es sich bei diesen Stämmen nicht um echte Paratyphus-B- bzw. Enteritidis-Gärtner-Bakterien handelt.

3) Neben den oben angeführten Bakterien finden sich im Rinderdarm auch paratyphus-B-ähnliche Bakterien, die aus Traubenzucker kein Gas bilden, ferner Paratyphus-A- und typhusähnliche Bakterien, schließlich echte *Faecalis*-Stämme. Die 3 erstgenannten Bakterienarten werden durch Paratyphus-B-, Paratyphus-A- bzw. Typhusserum nicht agglutiniert.

### Literatur.

- 1) Andrejew, P., Untersuchungen über die bakterielle Flora des Hammeldarmes auf das Vorkommen von Bakterien der Hochcholera-Gruppe. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 33. 1910. p. 363.)
- 2) Ankersmit, P., Untersuchungen über die Bakterien im Verdauungskanal des Rindes. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 39 u. 40.)
- 3) Aumann, Ueber Befunde von Bakterien der Paratyphusgruppe, mit besonderer Berücksichtigung der Ubiquitätsfrage. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 57. H. 4.)
- 4) Böhm, A., Die Anwendung der Ehrlichschen Indolreaktion für bakteriologische Zwecke. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 40. 1906.)
- 5) Burri, R. u. Andrejew, P., Vergleichende Untersuchungen einiger Coli- und Paratyphusstämmes. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 56. p. 217.)
- 6) Bussan, B., Ueber Coli-Mitagglutination durch Immunsere verwandter Arten und deren theoretische und praktische Bedeutung. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 57. 1911. p. 351.)
- 7) Buthmann, H., Ein Beitrag zur Frage der Verbreitung des *Bac. paratyphi B* und seine Beziehung zur gastrointestinalen Form der Fleischvergiftung. [Inaug.-Diss.] Gießen 1909.
- 8) McClintock, Charles, T., Boxmeyer, Charles, H. and Siffer, J. J., Studies on *hoc cholera*. (Journ. of infect. Diseases. Vol. 2. p. 351; ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 36. 1905. p. 761.)
- 9) Conradi, H., Eiskonservierung und Fleischvergiftung. (München. med. Wochenschrift. 1909. No. 18.)

- 10) Conradi, H., Eine neue Methode der bakteriologischen Fleischschau. (Zeitschr. f. Fleisch- und Milchhyg. 1909. H. 10.)
- 11) Crossonini, Ueber den Nachweis von Indol in bakterischen Kulturen mit der Ehrlichschen Methode. (Arch. f. Hyg. Bd. 72. 1910. p. 161.)
- 12) v. Drigalski u. Conradi, H., Ueber ein Verfahren zum Nachweis von Typhusbacillen. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 39. 1902.)
- 13) Eckert, Weitere Beiträge zum Vorkommen von Bacillen der Paratyphusgruppe im Darminhalt gesunder Haustiere und ihre Beziehungen zu Fleischvergiftungen. [Inaug.-Diss.] Gießen 1909.
- 14) Endo, S., Ueber ein Verfahren zum Nachweis von Typhusbacillen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 35. 1904.)
- 15) Erdmann, P. u. Winternitz, H., Ueber das Proteinochrom, eine klinisch und bakteriologisch bisher nicht verwertete Farbenreaktion. (München. med. Wochenschrift. 1903. No. 23.)
- 16) Ficker, M., Ueber den Einfluß des Hungerns auf die Bakteriendurchlässigkeit des Intestinaltrakts. (Arch. f. Hyg. Bd. 54. p. 354.)
- 17) —, Ueber den Einfluß der Erschöpfung auf die Keimdurchlässigkeit des Intestinaltrakts. (Arch. f. Hyg. Bd. 57. H. 1.)
- 18) Gaeltgens, W., Ueber das Vorkommen von Paratyphusbacillen (Typus B) im Wasser. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 30. 1909.)
- 19) Glaser, E., Zur Frage der Paratyphusinfektion durch Fleischwaren, zugleich ein Beitrag zur bakteriologischen Fleischuntersuchung. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 67. 1910. p. 457.)
- 20) Glasser, K., Zum heutigen Stande der Schweinepestfrage und zu den weiteren Untersuchungen von Uhlenhuth, Hübener, Xyländer und Bohtz über das Wesen und die Bekämpfung der Schweinepest und über die Bakteriologie der Hogcholera-(Paratyphus-B-)Gruppe. (Dtsche tierärztl. Wochenschr. 1909. No. 35.)
- 21) Grabert, K., Zur Herkunft des *Bacillus suispestifer*. (Zeitschr. f. Infektionskrankheiten d. Haustiere. Bd. 3. 1908. p. 218.)
- 22) Gwyn, Johns Hopkins Bull. Vol. 9. 1898.
- 23) Hamm, A., Ist der *Bacillus faecalis alcaligenes* für den Menschen pathogen? (München. med. Wochenschr. 1910. p. 239.)
- 24) Horn, A., Ein Beitrag zum Bakteriengehalt des Muskelfleisches gesunder und kranker Schlachttiere. (Zeitschr. f. Infektionskrankh. d. Haustiere. Bd. 8. 1910.)
- 25) Huber, E., Beiträge zur Bakteriologie des normalen Pferdedarmes, mit besonderer Berücksichtigung der Bakterien der Coli-Typhusgruppe. [Inaug.-Diss.] Leipzig 1910.
- 26) —, Die paratyphus-B-ähnlichen Bakterien des Pferdedarmes. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 56. 1910.)
- 27) Hüttemann, W., Beitrag zur Kenntnis der Bakterienflora im normalen Darmtraktus des Rindes. [Inaug.-Diss.] Bern 1905.
- 28) Joest, E., Ein durch Bakterien der Enteritisgruppe verursachte Karnarienvogel-seuche. (Bericht ü. d. Kgl. Tierärztl. Hochschule Dresden. 1906.)
- 29) —, Schweineseuche und Schweinepest. Jena 1906.
- 30) Kayser, H., Die Bakteriologie des Paratyphus. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 35. No. 2.)
- 31) Klein, E., Ueber die Verbreitung des *Bac. enteritidis* Gärtner in der Kuhmilch. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 38. H. 4.)
- 32) König, Zur Frage der Fleischvergiftungen durch das *Bact. paratyphi* B. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 50. 1909. H. 2.)
- 33) Komma, Fr., Ueber den Nachweis der Paratyphusbakterien in Wurstwaren und seine Verwertbarkeit für die Nahrungsmittelkontrolle. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 55. 1910. p. 1.)
- 34) Kolle, W., Ueber Paratyphus und den Wert der Immunitätsreaktionen für die Erkennung des Paratyphusbacillus. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 52. 1906. p. 287.)
- 35) Korte, W., Ein Beitrag zur Kenntnis des Paratyphus. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 44. 1903. p. 243.)
- 36) Kühnemann, G., Identifizierung des *Bacillus faecalis alcaligenes*. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 57. 1911. p. 469.)
- 37) Kutscher, K. H. u. Meinicke, E., Vergleichende Untersuchungen über Paratyphus-, Enteritis- und Mäusetyphusbakterien und ihre immunisatorischen Beziehungen. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 52. 1906. p. 301.)
- 38) Langkau, R., *Bacillus paratyphosus* B, *Bac. suispestifer* und *Bac. enteritidis* Gärtner im Vergleich zu den Erregern der Kälberruhr. [Inaug.-Diss.] Leipzig 1909.
- 39) Ledachbor, H., Der Paratyphusbacillus B bei geschlachteten Kälbern als Erreger miliarer Organnekrosen. (Zeitschr. f. Infektionskrankh. d. Haustiere. Bd. 6. 1909. p. 380.)

- 40) Lösener, W., Ueber das Vorkommen von Bakterien mit den Eigenschaften der Typhusbacillen in unserer Umgebung usw. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 11. 1895. p. 207.)
- 41) Morgan, Some observations upon the microorganisms of meat poisoning and their allies. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 38. 1905. p. 473.)
- 42) Mühlens, Dahm u. Fürst, Untersuchungen über Bakterien der Enteritisgruppe (Typus Gärtner und Typus Flügge), insbesondere über die sogenannten „Fleischvergiftungserreger“ und die sogenannten „Rattenschädlinge“. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 48. 1909. p. 1.)
- 43) Neubauer, J., Ueber anaerobe Bakterien im Rinderdarm. [Inaug.-Diss.] Bern 1905.
- 44) Nötzel, Beiträge zur klin. Chirurgie. Bd. 51. 1906. Ref. Conradi, Ueber den Keimgehalt normaler Organe. (München. med. Wochenschr. Jahrg. 56. No. 26.)
- 45) Petruschky, *Bacillus faecalis alcaligenes*. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 19. 1896.)
- 46) Pfeiffer, R. u. Kolle, W., Zur Differentialdiagnose der Typhusbacillen vermittelt Serums der gegen Typhus immunisierten Tiere. (Dtsche med. Wochenschr. 1896. No. 12.)
- 47) Pöhl zit. nach Lösener, W., Ueber das Vorkommen von Bakterien mit den Eigenschaften der Typhusbacillen in unserer Umgebung usw. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 11. 1895. p. 207.)
- 48) Poppe, K., Beiträge zur vergleichenden Biologie des *Bacillus suipestifer* und des *Bacillus paratyphi* B. (Zeitschr. f. Infektionskrankh. d. Haustiere. Bd. 5. 1908/09. p. 42.)
- 49) Rimpau, W., Beitrag zur Frage der Verbreitung der Bacillen der Paratyphusgruppe. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 30. 1909. p. 330.)
- 50) Rissling, P., Beiträge zur Biologie normaler Tiersera. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 44. 1907.)
- 51) Rogozinski, K., Ueber die physiologische Resorption von Bakterien aus dem Darne. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 34. 1904. p. 323.)
- 52) Rommler, Paratyphusbacillen im Transporte der Seefische. (Dtsche med. Wochenschr. 1909. No. 20.)
- 53) —, Ueber Befunde von Paratyphusbacillen in Fleischwaren. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 50. 1909. p. 501.)
- 54) Schmidt, P., Zur Frage der Ubiquität der Paratyphus-B-Bacillen. (München. med. Wochenschr. 1911. No. 11.)
- 55) Schmitt, F. M., Der *Bacillus paratyphosus* B als Krankheitserreger bei Kälbern. (Dtsche tierärztl. Wochenschr. 1908. No. 48.)
- 56) Schöne, Chr., Ueber Infektionen mit Paratyphusbacillen des Typus A und Befunde von verwandten Bakterien. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 65. 1910. H. 1.)
- 57) Schottmüller, Weitere Mitteilungen über mehrere das Bild des Typhus bietende Krankheitsfälle, hervorgerufen durch typhusähnliche Bacillen (Paratyphus). (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 36. 1901. p. 368.)
- 58) Seiffert, G., Studien zur Salmonellagruppe (Paratyphus-B-Gruppe). (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 13. 1909.)
- 59) Selter, H., Bakterien im gesunden Körpergewebe und deren Eintrittspforten. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 54. 1906. p. 363.)
- 60) Spät, W., Ueber Agglutinationsversuche mit normalem Rinderserum. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 54. p. 361.)
- 61) Streng, Osw., Studien über das Verhalten des Rinderserums gegenüber den Mikroben. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 50. H. 1.)
- 62) Telle, K. u. Huber, E., Kritische Betrachtungen über die Methoden des Indolnachweises in Bakterienkulturen, nebst einem Beitrage zur Frage der Indolbildung durch Typhaceen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 58. 1911. H. 1.)
- 63) Titze, C. u. Weichel, A., Die Aetiologie der Kälberruhr. (Berlin. tierärztl. Wochenschr. 1908. No. 26.)
- 64) Trautmann, H., Der *Bacillus* der Düsseldorfer Fleischvergiftung und die verwandten Bakterien der Paratyphusgruppe. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 45. 1903. p. 139.)
- 65) Twort, F. W., Die Vergärung der Glukosiden durch Bakterien aus der Typhus-Coli-Gruppe und der Erwerb neuer Vergärfähigkeiten seitens des *Bacillus dysenteriae* und anderer Mikroorganismen. (Royal Soc., London; ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 40. No. 15.)
- 66) Uhlenhuth u. Hübener, Ueber das Vorkommen von Bakterien der Paratyphus-B-Gruppe in der Außenwelt. (Vereinsbeil. d. dtsch. militärärztl. Zeitschr. 1908. p. 27.)
- 67) Uhlenhuth, Hübener, Xylander u. Bohtz, Untersuchungen über das Wesen und die Bekämpfung der Schweinepest. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 27. 1908.)

- 68) Uhlenhuth, Hübener, Xylander u. Bohtz, Weitere Untersuchungen über das Wesen und die Bekämpfung der Schweinepest, mit besonderer Berücksichtigung der Bakteriologie der Hogcholera-(Paratyphus-B-)Gruppe sowie ihres Vorkommens in der Außenwelt. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 30. 1909.)
- 69) Zupnik, L., Ueber gattungsspezifische Immunitätsreaktionen. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 49. p. 447.)
- 70) Zwick u. Weichel, Zur Frage des Vorkommens von sogenannten Fleischvergiftungserregern in Pökelfleischwaren. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 33. H. 2.)

*Nachdruck verboten.*

## Zur Frage über die Streptothrichosen des Zentralnervensystems.

[Aus dem pathologisch-anatomischen Institute der Moskauer Universität.]

Von Privatdozenten S. Abramow.

Mit 2 Figuren.

Die Benennung *Streptothrix* finden wir zum ersten Male im Jahre 1839 bei dem Botaniker Corda<sup>1)</sup>, der mit diesem Namen eine Art aus der Familie der Ascomycetes bezeichnet hat, welche der *Botrytis* sehr nahe steht. Trotzdem hat der bekannte Botaniker F. Cohn<sup>1)</sup> dieselbe Bezeichnung Schimmelpilzen ganz anderen Ursprungs beigelegt, die von Gräffe und Förster im *Canalis lacrymalis* des Menschen beschrieben und von Gräffe fälschlich mit dem Räudenerreger, von Waldeyer aber mit dem *Leptothrix buccalis* identifiziert waren.

Die von Cohn fälschlich gebrauchte Bezeichnung wird bis jetzt vom größten Teile der Autoren beibehalten. Der zum ersten Male beim Menschen von Gräffe beschriebene Pilz erregte besonderes Interesse, nachdem durch die Arbeiten von Kantak und anderen Autoren festgestellt worden war, daß ein ähnlicher Pilz der Erreger der tropischen Krankheit „Pied de Madoure“ ist. Durch die weiteren Arbeiten wurde festgestellt, daß *Streptothrix* schwere, tödliche Affektionen der Lunge hervorrufen kann (Aoyama und Miyamoto<sup>2)</sup> in Japan, Norris und Larkin<sup>3)</sup> in Nordamerika, Bith und Leishman<sup>2)</sup> in Südafrika).

Die Frage nach der Stellung dieses Pilzes im botanischen System gehört nun zu den verwickeltsten in der Bakteriologie. Nach der Klassifikation von Petruschky<sup>3)</sup> sind *Actinomyces*, *Streptothrix*, *Cladothrix* und *Leptothrix* Gattungen der *Trichomycetenfamilie* aus der *Hyphomycetenordnung*. Ihre charakteristischen Eigenschaften sind: *Actinomyces* bildet echte Verästelungen und ist durch strahlenförmige Anordnung in dem Organismus charakterisiert (Drusen).

*Streptothrix* bildet echte Verzweigungen, aber ohne strahlenförmige Anordnung.

*Cladothrix* bildet keine echten Verästelungen (seitliche Sprengung der Hülle zur Fortsetzung des Längenwachstums) und zerfällt relativ früh in Stäbchenformen.

1) Zitiert nach Berestnew und Petruschky.

2) Zitiert nach Petruschky.

3) Die pathogenen *Trichomyceten*. (Kolle u. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorgan. Bd. 2. Jena 1903.)

*Leptothrix* bildet keine Verzweigungen.

Berestnew<sup>1)</sup> ist ganz anderer Meinung über die Klassifikation der Pilze, die Petruschky unter der Bezeichnung *Trichomyceten* zusammenfaßt. Er behauptet, die Echtheit der Verästelung von *Cladothrix* sei zweifellos (p. 10), und identifiziert somit diesen Pilz mit *Streptothrix*. Weiter, von dem Satze ausgehend, daß die Bezeichnung *Streptothrix* nur in der Bedeutung, die ihr Corda zum ersten Male beigelegt hatte, gebraucht werden kann, schlägt Berestnew vor, die Benennung ganz aus der Bakteriologie auszuschließen, um sie den Botanikern zu überlassen. Er identifiziert *Streptothrix* und *Cladothrix* mit *Actinomyces*, und nennt diese beiden Arten „atypische Aktinomykose“, indem er als ihre charakteristischen Merkmale die echte Verzweigung mit Abwesenheit von Drusenbildung in dem Organismus und ihre Färbbarkeit nach Ziehl betrachtet. Diese letztere Eigenschaft hält er für so konstant, daß er auf p. 77 sagt: „..... alle *Actinomyces*-Pilze, die die „atypische Aktinomykose“ hervorrufen, färben sich nach Ziehl.“

Was die von uns berührte Frage über die Streptothrichosen des Zentralnervensystems betrifft, so ist ihre Literatur nicht allzu groß.

Den ersten Fall hat Eppinger<sup>2)</sup> beschrieben. Es handelte sich um einen Glaschleifer, der unter den Erscheinungen der Hemiplegie starb. Bei der Sektion wurde ein mit Meningitis komplizierter Abszeß in der rechten Hemisphäre des Großhirns, Pseudotuberkulose der Lunge, Verkalkung der peribronchialen Drüsen und ein Eiterherd in einer der supraklavikularen Drüsen gefunden. Die bakteriologische Untersuchung des Abszeßleiters und der peribronchialen und supraklavikularen Drüsen ergab eine große Menge von Fäden eines nach Gram sich färbenden Pilzes. In den Lungenknötchen wurde er nicht gefunden. Der Pilz wurde von Eppinger in Reinkultur isoliert. Er hatte Eigenbewegung und gedieh auf allen allgemein gebräuchlichen Nährböden, langsames, aber üppiges Wachstum entwickelnd und einen roten Farbstoff (auf Kartoffeln) bildend. Für die Kulturen empfänglich zeigten sich Meerschweinchen und Kaninchen; die kranken Tiere boten das Bild der Pseudotuberkulose dar, und es gelang Eppinger, bei ihnen denselben Pilz nachzuweisen. Mäuse haben sich nicht empfänglich gezeigt. Eppinger zählte seinen Pilz den *Cladothrices* zu, da er seine Verästelungen für unecht hielt. Petruschky (l. c.) aber, welcher die Präparate von Eppinger studierte, fand, daß der Pilz viel Gemeinsames mit *Streptothrix* habe. An den Zeichnungen von Eppinger selbst sieht man deutlich die falschen Verästelungen. Doch neben ihnen gibt es auch gewisse Bilder von echter Astbildung. Auf Grund dieser Abbildungen wären wir geneigt, mit Petruschky den Pilz von Eppinger als *Streptothrix* aufzufassen.

Im Jahre 1895 wurden in Frankreich zwei Fälle von Gehirnstreptothrichose beschrieben. Ferré und Faquet<sup>3)</sup> beobachteten einen Gehirnabszeß im Centrum ovale, der durch *Streptothrix* hervorgerufen worden war. Experimente an Meerschweinchen und Kaninchen hatten zweifelhafte Resultate. Einen ähnlichen Fall haben Sabrazès und Rivière<sup>4)</sup> beschrieben. Im Falle Ritters<sup>5)</sup> erschien der Gehirnabszeß als eine Komplikation der Pleuritis. Den Pilz in Reinkultur zu isolieren, ist dem Verf. nicht gelungen.

Im Jahre 1897 hat Berestnew (l. c.) einen Fall von (wie er es genannt) „atypischer Aktinomykose“ des Gehirns beschrieben. Bei der Sektion fand er eine alte, sich vernarbende Tuberkulose der Lungenspitzen. Daneben wurde eine aktinomykotische Bronchopneumonie mit einer Kaverne entdeckt, in deren Inhalt ein verzweigter, nach Ziehl sich färbender Pilz gefunden wurde (der Pilz wurde noch beim Leben der Kranken im Sputum nachgewiesen). Im Großhirne wurden zwei Abszesse, welche denselben Pilz enthielten, und eine eitrige Entzündung der weichen Hirnhäute gefunden. In den Schnitten Drusen zu entdecken, gelang nicht.

1) *Actinomykose und ihre Erreger*. Moskau 1897.

2) *Zieglers Beiträge*. Bd. 9.

3) *Semaine méd.* 1895.

4) *Semaine méd.* 1895.

5) *Prag. med. Wochenschr.* 1900.

Der Pilz wurde in Reinkultur gewonnen und erwies sich als pathogen für Kaninchen, Meerschweinchen, Mäuse, Ratten und Hunde. Subkutan und intraperitoneal eingespritzt, rief er chronische, eiterige Entzündungen hervor. Die Injektion in das Blut blieb resultatlos. Bei subduraler Injektion bekamen Meerschweinchen eine Eruption von Miliartuberkulose, Kaninchen dagegen eingekapselte Eiterherde.

Im Jahre 1899 hat Ferrari<sup>1)</sup> einen Fall von Gehirnsabszeß beschrieben, der als Komplikation der Vereiterung einer Bronchialdrüse auftrat und durch Streptothrix hervorgerufen war. Der Autor hat keine Kulturen gewonnen.

Im Jahre 1900 wurde von Chiari<sup>2)</sup> ein Fall von eitriger Myelitis bei Bronchoektasie beschrieben. Bei der Autopsie fand man einen Kleinhirnsabszeß und drei Eiterherde im Rückenmark, kompliziert mit cerebrospinaler Meningitis. In den Ausstrichpräparaten, die bei der Sektion angefertigt wurden, konstatierte man Pneumoniediplokokken, die es dem Verf. auch in Kultur zu isolieren gelang. Die Untersuchung der Schnitte aus der Wandung der Eiterherde ergab darin Geflechte feiner Fäden, die man in den Ausstrichpräparaten übersehen hatte. Diese Fäden bildeten echte Verästelungen und färbten sich nach Gram. Den Pilz in Reinkultur zu züchten, gelang nicht, denn die Aussaaten wurden am zweiten Tage nach dem Nachweise der Diplokokken vernichtet. In seinen Schnitten ist es dem Verf. nicht gelungen, Actinomyces-Drusen mit ihren charakteristischen Kolben zu entdecken. Trotzdem charakterisiert er seinen Pilz als „eine Streptothrix-Art, welche dem Genus Actinomyces direkt angehört oder wenigstens demselben sehr nahe steht“. Das Fehlen charakteristischer Drusen schließt nach Chiari die Diagnose der Aktinomykose nicht aus, denn nach seiner Meinung gibt es öfters auch bei echter Aktinomykose im Gehirn keine Drusen. Als Beweis führt er einen Museumsfall von Aktinomykose an, bei welcher die charakteristischen Drusen in den inneren Organen vorhanden waren, der Gehirnbefund jedoch dem entsprach, was er im beschriebenen Falle gefunden.

Im Jahre 1901 beschrieben Pribytkow und Maloletkow<sup>3)</sup> einen Fall von Rückenmarkabszeß. Das Rückenmark war auf der ganzen Strecke vom Conus medullaris bis zum zweiten Brustsegmente betroffen. Der Eiterherd war in der Mitte des Rückenmarks gelegen (ohne den Zentralkanal zu berühren) und mit Cerebrospinalmeningitis kompliziert. In den Eiterausstrichen wurden verästelte Fäden eines Pilzes nachgewiesen, die sich nach Ziehl färbten und nach Gram entfärbten. In den Rückenmarksschnitten lagerten sich die Fäden in üppigen Geflechten ohne kolbige Verdickungen an den Endspitzen. Der Pilz in Reinkultur zu isolieren, ist den Autoren nicht gelungen. Ihren Pilz rechnen sie zur „atypischen Aktinomykose“. Die Eintrittspforte der Infektion konnte nicht festgestellt werden.

Im Jahre 1903 beschrieben Löhlein und Engelhardt<sup>4)</sup> einen Fall von Streptothrix-Pyämie. Neben einer eitrigen Pleuritis und Peritonitis und einer Affektion der meisten inneren Organe fanden sie multiple Abszesse im Gehirn. Die von den Verff. gezüchtete, nicht säurefeste Kultur erwies sich als pathogen für Mäuse und Kaninchen, bei welchen sie, in das Blut injiziert, eine Knötchenaffektion aller inneren Organe hervorrief.

In demselben Jahre teilte Horst<sup>5)</sup> einen Fall von multiplem Abszeß des Gehirns mit, welcher die Komplikation einer Streptothrichose der Bronchialdrüsen und der Lunge darstellte. Die von dem Verf. reingezüchtete Kultur eines säurefesten Pilzes erwies sich als pathogen für Kaninchen und Meerschweinchen, bei welchen sie die Erscheinungen der Pseudotuberkulose hervorrief. Der Pilz von Horst besaß Eigenbewegung.

Im Jahre 1907 wurde von Löhlein<sup>6)</sup> ein Fall beschrieben, welcher dem von Eppinger sehr glich. Bei der Autopsie eines 58-jähr. Kranken wurde neben Bronchoektasien ein multipler Abszeß des Gehirns gefunden. In seinem Eiter konnten verästelte Pilzfäden nachgewiesen werden, die auf Nährböden den gleichen Wuchs wie der Eppingersche Pilz zeigten. Die von Löhlein isolierte Streptothrix erwies sich als pathogen für Meerschweinchen und Kaninchen, bei welchen sie Erscheinungen von Pseudotuberkulose hervorrief, analog dem von Eppinger beschriebenen. Hunde reagierten auf die Einspritzungen gar nicht.

Im Jahre 1910 berichtete C. Sternberg<sup>7)</sup> auf dem Kongresse der Deutschen Pathologischen Gesellschaft über einen Fall von Cerebrospinalmeningitis, der durch Streptothrix hervorgerufen war. Es war ihm gelungen, den Pilz noch bei Lebzeiten

1) Wien. klin. Wochenschr. 1899.

2) Zeitschr. f. Heilk. Abt. f. path. Anat. Bd. 21.

3) Zeitschr. f. Neuropathol. u. Psychiat. (Korsakow). Bd. 1.

4) Arch. f. klin. Med. Bd. 73.

5) Zeitschr. f. Heilk. (path. Anat.). Bd. 24.

6) München. med. Wochenschr. 1907. No. 31.

7) Verhandl. d. Deutsch. Path. Gesellsch. 1910.



des Kranken aus der durch Punktion gewonnenen cerebrospinalen Flüssigkeit zu züchten. Der Pilz färbte sich nach Gram, bildete echte Verzweigungen und gedieh nur auf Bouillon. Verf. versuchte, Meerschweinchen und Kaninchen mit der lumbalen Flüssigkeit intraperitoneal und intravenös zu infizieren. Es starben zwei Kaninchen, die subdural infiziert waren, am 16. und 40. Tage, die übrigen Tiere blieben gesund. Bei den toten Tieren fand man an der Injektionsstelle Abszesse, in deren Ausstrichpräparaten schlecht gefärbte, zerfallende Pilzfäden nachgewiesen wurden. In Reinkulturen sie zu isolieren, gelang nicht. Die Sektion ergab: Otitis media sinistra, thrombophlebitis sin. petrosi et transversi meningitis cerebrospinalis purulenta.

Aus dem Exsudate der Gehirnhäute, dem Sinusthrombus und dem Inhalt der Ventrikel wurden Reinkulturen von Streptothrix gezüchtet. Das Exsudat des mittleren Ohres ergab neben der Streptothrix-Kultur verschiedene Kokken und Stäbchen. Bei der Untersuchung der Gehirnhautschnitte wurden einzelne Pilzfäden entdeckt. Drusen waren nicht nachweisbar.

Zur Ergänzung des Vortrags von Sternberg teilte Wiesner einen von ihm beobachteten analogen Fall von Mittelohrentzündung mit, die mit einer eitrigen Meningitis kompliziert war. In dem Exsudate des Ohres und der Gehirnhäute wurde Streptothrix nachgewiesen und in Reinkultur gezüchtet.

\* \* \*

Unsere eigenen Untersuchungen betreffen eine im pathologisch-anatomischen Institute der Moskauer Universität ausgeführte Sektion des Kranken G. M., der in der inneren Hospitalklinik gestorben ist.

Anamnese: Der Kranke, Portier der gynäkologischen Klinik, stammt aus dem Gouvernement Smolensk. Seit dem Alter von 21 Jahren Abusus in baccho, im Alter von 25 Jahren litt er an Harninkontinenz, in dem von 39 Jahren hat er an einer Phlegmone am rechten Arm gelitten, im 42. Jahre überstand er eine Operation wegen einer rechtsseitigen Inguinalhernie. Im Jahre 1903 hatte er Schmerzen in der linken Brustseite, sowie einen starken Husten mit Ausscheidung großer Mengen übelriechenden Sputums und Hämoptoe.

Status praesens. Die Supra- und Intraclaviculargruben stark eingezogen, rechts etwas stärker. Beim Atmen bemerkt man keinen Unterschied in der Bewegung der beiden Brustseiten. Bei der Perkussion ist der Schall über der rechten Spitze gedämpfter, als über der linken. Hinten ganz unten bemerkt man eine gewisse Schall-differenz; links ist der Schall gedämpfter. Bei der Auskultation verschärfte Expiration und rauhes Atmen in beiden Lungenspitzen. Hinten links unten feuchtes Rasseln.

Die Sputumuntersuchung ergab sich verzweigende Bakterien in großer Menge. Tuberkelbacillen wurden nicht nachgewiesen.

Klinische Diagnose: Caverna et gangraena in lobo inferiore pulmonis sinistri. Meningitis purulenta metastatica (convexitalis).

Die von Dr. Iwanow am 20. September 1908 ausgeführte Autopsie ergab folgendes:

Leiche eines Mannes von genügender Ernährung und regelmäßigem Körperbau; Hautdecken blaß, Unterhautfettgewebe schwach, Muskulatur genügend entwickelt; Schädeldecken ohne Veränderung; das Schädeldach dünn; die Dura mater fest mit den Schädeldecken verwachsen, ihre Sinusse im Zustand der Stauung; die weiche Hirnhaut an der Basis mit grünlichem Eiter infiltriert, ihre Gefäße hyperämisch. Im rechten Occipitallappen gleich unter der Oberfläche des Gehirns liegt ein hühnereigroßer Abszeß mit ziemlich derber Wandung. Im linken Stirnlappen befindet sich ebenfalls ein hirsenskorngroßer Abszeß. In Ventrikelhöhlen und im Aqueductus Sylvii sieht man Eiteranhäufungen. Das Ependym ist hyperämisch.

Das Zwerchfell steht auf beiden Seiten auf der Höhe der 5. Rippe. Die rechte Pleurahöhle ist frei, die linke enthält derbe, fibröse Verwachsungen. Im Herzbeutel einige Tropfen seröser Flüssigkeit. Herzmaße  $11\frac{1}{2} \times 11$  cm, Dicke der linken Ventrikelwandung 1 cm. Epicard glatt, glänzend; Muskulatur schlaff, von grauer Farbe. Endocard glatt, im Zustand der Leichenimbibition. Herzklappen unverändert, Aorta, Lungenarterie und Koronargefäße ebenfalls. Im Unterlappen der linken Lunge befindet sich eine orangengroße Höhle; ihre Wände sind glatt, derb, an mehreren Stellen gestrichelt und mit grünlichem Eitersekrete bedeckt. Die Höhle liegt unter der Lungenoberfläche und enthält eine Perforation in das Gebiet der oberflächlichen Verwachsungen der Lunge, so daß in der Pleurahöhle ein eingekapselter Eiterherd sich gebildet hat. Neben ihr befinden sich einige Höhlen von weit kleineren Dimensionen, welche im derben, für Luft schlecht durchgängigen, grünlichen Lungenparenchym liegen. Auf der Schnittoberfläche der rechten Lunge sieht man deutlich grau-weißliche Infil-

trationsherde um die Bronchien, welche über die Schnittoberfläche hervorragen und zum Teil miteinander verschmolzen sind. An der Schnittoberfläche beider Lungen tritt auf Druck aus den Bronchien ein eitriges Sekret hervor. Die Schleimhaut der Luftröhre und des Kehlkopfes ist geschwollen, dunkelrot und von mit Blut untermischtem Schleime bedeckt. Das Peritoneum ist glatt, glänzend, etwas verdickt. Die Milz (ihre Maße sind  $12 \times 8 \times 2$ ) hat eine schlaife Konsistenz, die Schnittoberfläche ist graurot. Von der Schnittoberfläche läßt sich eine bedeutende Menge Pulpa abschaben. Längs der Gefäße befindet sich eine Bindegewebswucherung. Maße der Nieren:  $12 \times 7 \times 3,5$  cm. Ihre Kapsel läßt sich schwierig ablösen, die Oberfläche ist glatt mit deutlich sichtbaren, injizierten Venen. Auf der Schnittoberfläche ist das Nierenparenchym graurot. In der Rindensubstanz der rechten Niere befindet sich eine zedernußgroße Cyste. Die Harnblase ist ausgedehnt, ihre Schleimhaut unverändert. Maße der Leber:  $23 \times 15 \times 8$  cm. Ihr Parenchym ist von grau-roter Farbe. Im vorderen Lappen befindet sich ein kleines kavernoöses Angiom. Die Schleimhaut des Magens ist von rosiger Farbe, in der Gegend des Pylorus findet man ein kleines rundes Geschwür, sowie ein gleiches Geschwür im Duodenum hart am Magenausgang.

Die übrigen Organe zeigen keine Veränderungen.

Anatomische Diagnose: *Vomicae bronchoectaticae* Gangraena pulmonum. Bronchopneumonia lobularis acuta. Pneumonia chronica indurativa. Pleuritis purulenta saccata sinistra. Abscessus cerebri. Ependymatitis acuta purulenta. Degeneratio parenchymatosa myocardii hepatis et renum. Hyperplasia pulpae lienis. Ulcera rotunda partis pyloricae ventriculi et duodeni.

Mikroskopische Untersuchung. Bei der Autopsie wurde eine mikroskopische Untersuchung des Gehirnsabszeßes vorgenommen. In den mit Löfflers Methylenblau gefärbten Ausstrichpräparaten fand Dr. Skwortzow eine bedeutende Menge verästelter Bakterien. Längere Fäden wurden nicht nachgewiesen. Außerdem wurden für die mikroskopische Untersuchung einige Stückchen der Wandung des Gehirnabszesses aus dem rechten Occipitallappen, der ganze Abszeß aus dem linken Frontallappen, einige Stückchen aus der Wandung der bronchoektatischen Kaverne der linken Lunge und aus verschiedenen Gebieten der beiden Lungen entnommen. (Fixation mit 10-proz. Formalin, Einbettung in Celloidin, Färbung mit Hämateineosin, nach Gram und mit Löfflerschem Methylenblau.)

Die Gehirnabszesse waren von einer Bindegewebskapsel umgeben, die mit Eiterzellen stark infiltriert war. Um den großen Abszeß des Occipitallappens fand man in der Gehirnschubstanz kleine Infiltrationen aus Eiterzellen. Bei der Färbung nach Gram und nach Ziehl konnten Mikroorganismen nicht nachgewiesen werden. Bei der Färbung mit Löfflerschem Methylenblau nach dem üblichen Verfahren (20 bis 30 Minuten langes Färben, Differenzierung in essigsauerm Alkohol) fand man zwischen den Eiterzellen in der Wan-

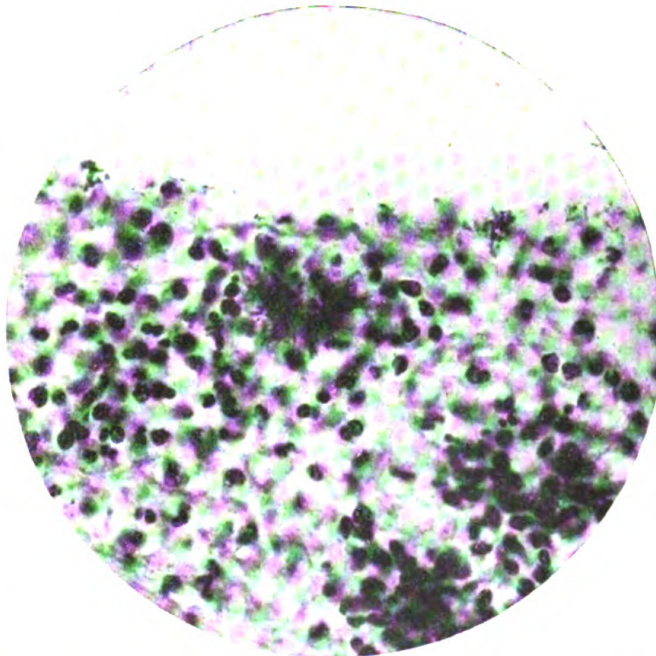


Fig. 1. Wand des Gehirnabszesses. An ihrer Oberfläche ein Pilzfadengeflecht. Färbung mit Loefflerschem Methylenblau. Vergrößerung etwa 600-fach.



derung des Gehirnabszesses blasse, kaum bemerkbare Pilzfäden. Bessere Resultate erhielten wir mit folgender Färbungsmethode: Mittels einer Mischung von absolutem Alkohol und Aether vom Celloidin befreite Schnitte wurden für 24 Stunden in Löfflerschem Methylenblau belassen und darauf nach der gebräuchlichen Methode differenziert. Bei solcher Behandlung färbten sich die Pilzfäden sehr intensiv und traten deutlich hervor. Sie waren zwischen den Eiterzellen in Form von einzelnen Geflechten gelagert, welche eine charakteristische sternförmige Anordnung aufwiesen (Fig. 1) und keine bedeutende Größe erreichten. Die Fäden waren gewöhnlich ziemlich kurz. Zuweilen fand man auf den frei aus den Geflechten hervortretenden Fadenspitzen kolbige Verdickungen. In den kleinen Eiterinfiltraten um den großen Abszeß fand man keine Fäden. Im Abszesse des Frontallappens war eine große Menge von verästelten Pilzfäden nachzuweisen, die diffus die ganze Abszeßsubstanz durchsetzten.

Die Lunge wies auf den Hämateineosinpräparaten folgendes Bild auf: Die Wandung der bronchoektatischen Kaverne besteht aus grobfaserigem Bindegewebe, das an Blutgefäßen sehr reich ist. Sie ist mit Eiterzellen stark infiltriert, die Kavernenhöhle stellenweise mit Zylinderepithel ausgekleidet. Das sie umgebende Lungengewebe ist fibrös degeneriert. Die Alveolarstruktur ist schwer erkennbar, die Alveolenwände deutlich verdickt, bestehen aus derbem, fibrösem Gewebe, das mit Eiterzellen infiltriert ist. Die übrigen Lungenpartieen bieten folgendes Bild dar: Die kleinen Bronchien sind stark dilatiert. Ihr Lumen ist von Eiterzellen, die stellenweise mit Zylinderepithel untermischt sind, ausgefüllt. In einigen Bronchien ist das Epithel erhalten und bildet einen kompakten Gürtel. Das die affizierten Bronchien umgebende Lungengewebe ist narbig degeneriert, ohne Anzeichen von Alveolarstruktur, reich an Blutgefäßen und mit Eiterzellen infiltriert. Weiter vom Bronchus entfernt erscheint die Alveolarstruktur wieder. Die Alveolenwände sind stark verdickt, bestehen aus derbem Bindegewebe, das reich an Blutgefäßen und mit Eiterzellen infiltriert ist. Die Alveolenhöhlen sind stark verengt, mit kubischem Epithel ausgekleidet und enthalten Eiterzellenanhäufungen. Je weiter man sich von den affizierten Bronchien entfernt, desto schwächer ausgeprägt wird der interstitielle Prozeß und das Lungengewebe nähert sich allmählich dem normalen Bau. Bei der Färbung mit Löfflerschem Methylenblau nach der oben erwähnten Methode wurden im eitrigen Exsudat der Bronchien verästelte Pilzfäden gefunden. Bald lagerten sie zwischen den Eiterzellen in Form von vereinzelt Fäden, bald in Form von sternförmigen, den beim Gehirnabszesse beschriebenen analogen Geflechten.

Die Färbung nach Gram und Ziehl hatte negative Resultate. In der Wandung der bronchoektatischen Kaverne gelang es nicht, die Pilzfäden nachzuweisen.

---

Untersuchung der Reinkulturen. Die Reinkultur des Pilzes wurde bei der Autopsie aus dem Gehirnabszesse auf dem Wassermannschen Nährboden von Dr. M. Skwortzow gewonnen. Unsere Untersuchung des Wachstums des Pilzes auf verschiedenen Nährböden stellte folgendes fest:

Am üppigsten entwickelt sich der Pilz auf Wassermannschem Nährboden und auf Glyzerinagar. Auf diesen Nährböden erhält man

schon nach 24 Stunden bei 37° einen feinen, matten, ungleichmäßigen Belag von zartrosiger Farbe. Die Pigmentbildung steigert sich mit der Zeit. Das Wachstum ist ziemlich langsam, doch üppig. Die 5—7-tägige Kultur sieht wie ein massiver, in Falten gelegter, matter Belag von hübscher, blaßrosa Farbe aus. Auf Agar ohne Glyzerinzusatz erzielt man auch Wachstum, aber ein viel geringeres. Auf Kartoffel zeigt der Pilz ein ziemlich üppiges Wachstum mit Pigmentbildung, doch entwickelt er sich viel langsamer, als auf Glyzerinagar. Bei Aussaat auf Bouillon erhält man nach 24 Stunden eine dichte Trübung und eine zarte, oberflächliche Membran, die nach einiger Zeit in Form eines krümeligen Niederschlages zu Boden sinkt, wonach die Bouillon wieder ganz klar wird. Ältere Bouillonkulturen sehen wie ein kompakter, scholliger Niederschlag auf dem Boden des Reagensgläschens aus. Pigmentbildung findet in Bouillon nicht statt. Gelatine wird nicht verflüssigt. Strichkulturen auf Zuckeragar haben die Gestalt eines durchgehenden Pfropfens längs des Stiches. Auf der freien Agaroberfläche erhält man ebenfalls Wachstum in Form eines massiven, pigmentierten, gefalteten Belags. Bildung von Gasbläschen beobachtet man dabei nicht. Der Pilz bildet kein Indol, reduziert Farbstoffe nicht, Lackmusbouillon zeigt nach 24 Stunden eine saure Reaktion. Wachstum erzielt man bei 37° sowie bei Zimmertemperatur. Im letzten Falle geht es viel langsamer vor sich.

Bei der Züchtung auf Zuckerbouillon in Wasserstoffatmosphäre bei 37° bleibt das Wachstum aus. Bei Zimmertemperatur erscheint nach Verlauf von 24 Stunden ein zarter, oberflächlicher Belag, der nach einiger Zeit sich als ein scholliger Bodensatz niederschlägt. Beläßt man eine anaerobe Kultur, welche einige Tage bei 37° verweilt hatte, bei Zimmertemperatur, so tritt dennoch Wachstum am zweiten Tage ein. Kulturen, welche im Thermostaten 2 Wochen verweilt hatten, gaben kein Wachstum bei Zimmertemperatur.

Die mikroskopische Untersuchung der auf verschiedenen Nährböden gezüchteten anaeroben wie aeroben Kulturen ergab beinahe gleiche Resultate. Der Pilz wächst in Form von Stäbchen von verschiedener Länge, welche echte Verästelungen zeigen und öfters an den Enden kolbig angeschwollen sind. Lange verästelte Fäden waren in den Kulturen gewöhnlich entweder nicht nachzuweisen oder in sehr geringer Zahl. Stäbchen färbten sich gut mit den gewöhnlichen Anilinfarben, entfärbten sich nicht nach Gram und sehr schnell nach Ziehl.

Etwas andere Resultate gab uns die Anwendung der Methode der fraktionierten Aussaat von Kedrowsky<sup>1)</sup>. Bei der Aussaat auf Petri-Schalen mit Glyzerinagar oder Wassermannschem Nährboden entwickelten sich meist zweierlei Kolonien (alle beide pigmentiert). Die Mehrzahl war glatt, weich, flach und am Nährboden schwach haftend. Solch eine Kolonie war auf der Agarplatte mit einer Platinnadel leicht auszustreichen. Bei der mikroskopischen Untersuchung erwies sie sich als aus verästelten Stäbchen bestehend. Neben solchen Kolonien gab es gewöhnlich mehrere Kolonien von anderem Aussehen. Sie waren kleiner, sahen runzelig, bauchig, trockener als die eben beschriebenen Kolonien aus, saßen dem Nährboden fest an und erwiesen sich als härter. Beim Versuch, eine solche Kolonie mit der Platinnadel zu erfassen, ließ sie sich nur schwer und im ganzen von dem Nährboden abheben. Solche Kolonien erschienen unter dem Mikroskope als ein

1) Zeitschr. f. Hyg. Bd. 66.

Geflecht von langen, verästelten Fäden. Reagensgläschenaussaat der ersteren Kolonien ergab Stäbchenkulturen. Bei der Aussaat der letzteren wogen die Fadenformen vor. Aber schon die zweite Generation degenerierte gewöhnlich zu Stäbchenformen. Mittels Plattenkulturen gelang es jedoch, daraus wieder Fadenkolonien zu erhalten.

Die nach Gram gefärbten Präparate solcher Kulturen und Kolonien erwiesen sich als aus feinen, langen, vielfach verästelten Fäden bestehend. Die Fäden färbten sich gleichmäßig und besaßen oft kolbige Anschwellungen an den freien Enden. Bei der Methylenblaufärbung zeigte sich ihre feinere Struktur. Die Endkolben färbten sich am intensivsten. Der Faden selbst färbte sich ungleichmäßig und enthielt gewissermaßen Unterbrechungen, wobei die intensiv gefärbten Fadenteile durch blässere

Gebiete verbunden waren, in denen nur die Hülle intakt geblieben war.

Analoge Bilder konnte man auf den nach Gram gefärbten Präparaten, jedoch viel seltener, sehen (Fig. 2).

Die Verästelung der Fäden mußte man bei beiden Färbungsmethoden als eine echte ansehen. Ziemlich oft kam auch das Bild der unechten Astbildung vor; an einen langen Faden stieß unter einem Winkel ein kürzerer, ohne mit ihm in direkter Verbindung zu stehen. Solche Bilder gab es öfter auf den mit Methylenblau gefärbten Präparaten. Doch bei genauerem Hinsehen erkannte man öfters, daß die Unter-



Fig. 2. Reinkultur des Pilzes. Man sieht deutlich echte Verästelungen und kolbige Anschwellungen an den Fadenenden. Oben eine leere, blaß gefärbte Hülle des Fadens. Färbung nach Gram. Vergrößerung etwa 1000-fach.

brechung an der Stelle des Abgehens des Nebenfadens nur eine scheinbare war, und daß es sich hier nur um eine blaß gefärbte Hülle handelte.

Auf den Gram-Präparaten waren derartige Bilder wegen gleichmäßigerer Färbung der Fäden selten zu sehen. Aber auf diesen, wie auf jenen Präparaten waren unschwer Bilder wahrzunehmen, die für die Echtheit der Verästelungen, welche gewöhnlich unter einem Winkel von  $90-45^\circ$  abgingen, ganz beweisend waren. Die von den Hauptfäden abgehenden Nebenfäden verästelten sich ebenfalls sehr häufig und endeten nicht selten mit kolbigen Anschwellungen.

Das Abgehen von Aesten beeinflusste für gewöhnlich nicht die Dicke des Fadens, die auf den Gesamtverlauf der Haupt- und Nebenfäden die völlig gleiche blieb.

Die Tierversuche wurden mit 4—5-tägigen Agarkulturen angestellt. Die Masse solch einer Kultur wurde mit einem Platinspatel in 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung sorgfältig verrieben, bis man eine feine, homogene Emulsion erhielt, worauf sie den Tieren eingespritzt wurde.

**Erster Versuch.** Am 28. Juli 1910 bekam eine weiße Maus intravenös 0,3 ccm der Emulsion. Die Maus starb im Verlauf von 24 Stunden. Bei der Sektion fand man eine starke Vergrößerung der Milz. Aussaaten aus dem Herz- und Milzblut blieben steril.

**Zweiter Versuch.** Am 28. Juli 1910 spritzte man einer weißen Maus subkutan 0,3 ccm der Emulsion ein. Der Tod trat am 1. August ein. An der Injektionsstelle ein erbsengroßer Abszeß mit dickem, rahmartigem Eiter. Milz stark vergrößert, ihre Follikel hyperplasiert. In dem Abszeßausstriche verästelte Stäbchen mit kolbig geschwollenen Enden, die sich sehr schwach und ungleichmäßig färbten. Im Milzausstriche keine Mikroorganismen. Aussaaten aus dem Abszeßeiter und dem Herzblute blieben steril.

**Dritter Versuch.** Am 28. Juli 1910 erhielten 4 weiße Ratten subkutan 0,5 ccm der Emulsion. Alle 4 blieben am Leben, ohne irgendwelche lokale und allgemeine Erscheinungen darzubieten.

**Vierter Versuch.** Am 20. Sept. 1910 bekamen 2 Meerschweinchen subkutan je 0,5 ccm der Emulsion. Am 25. Sept. bei beiden an der Injektionsstelle haselnußgroße Abszesse. In den Ausstrichpräparaten keine Mikroorganismen. Aussaaten steril.

**Fünfter Versuch.** Am 28. Sept. 1910 erhielt ein Kaninchen subkutan 1,0 ccm der Emulsion. Am 31. Sept. an der Injektionsstelle ein erbsengroßes Infiltrat, am 3. Oktober an der Injektionsstelle ein haselnußgroßer Abszeß mit dickem, rahmartigem Eiter. In den Ausstrichpräparaten keine Mikroorganismen. Kulturen steril.

**Sechster Versuch.** Am 28. Juli 1910 spritzte man einem Kaninchen intravenös 1,0 ccm der Emulsion ein. Das Kaninchen wurde bis zum 1. Dezember 1910 beobachtet, und war die ganze Zeit über gesund.

**Siebenter Versuch.** Am 7. Sept. 1910 erhielt ein Kaninchen subkutan 1,0 ccm der Emulsion, ein anderes 1,0 ccm der Emulsion von derselben Kultur, die jedoch während einer Stunde bei 56° getötet worden war. (Die Sterilität der Emulsion wurde durch Aussaat verifiziert.) Am 12. Sept. bei beiden an der Injektionsstelle haselnußgroße, mit dickem, rahmartigem Eiter gefüllte Abszesse, deren Ausstriche und Kulturen steril blieben.

**Achter Versuch.** Am 14. Sept. 1910 wurde an einem Kaninchen die Schädel-trepanation vorgenommen. Heilung per primam. Am 25. Sept. spritzte man ihm ins Gehirn 0,3 ccm der Emulsion. Tod an Apoplexie in der Nacht zum 26. Sept.

**Neunter Versuch.** Am 14. Sept. 1910 wurde an einem Kaninchen die Schädel-trepanation vorgenommen und nach der Durchschneidung der Dura mater mit einer feinen Platinnadel ein Stückchen einer 5-tägigen Agarkultur ins Gehirn eingeführt. Die Hautwunde verheilte per primam. Bis zum 25. Sept. wies das Kaninchen keine Gehirnsymptome auf. Am 25. Sept. wurde es getötet. Weiche Hirnhaut unverändert, an der Gehirnoberfläche die Spur des Stiches deutlich sichtbar. Ein Stückchen des Gehirns wird in 10-proz. Formalinlösung gehärtet und in Celloidin eingebettet. Die mikroskopische Untersuchung der Schnitte längs des Stiches zeigte eine starke eiterige Infiltration mit deutlich ausgesprochener Karyorrhesis. Auf den nach Gram und mit Methylenblau gefärbten Präparaten waren Pilzfäden nicht nachweisbar.

Die biologischen Reaktionen wurden am Kaninchen studiert<sup>1)</sup>. Am 21. Dez. 1910 wurde subkutan 1 ccm der Emulsion injiziert. Am 24. Dez. an der Injektionsstelle ein erbsengroßes Infiltrat; am 24. Dez. ein deutlich fluktuierender wallnußgroßer Abszeß. Es wurde eine Probeblutentnahme ausgeführt, wonach das Tier intravenös die Hälfte einer wöchentlichen Agarkultur erhielt. Weitere Blutentnahmen wurden am 5. und 22. Jan. 1911 vorgenommen. Das Serum von allen 3 Aderlässen wurde auf Agglutination, Präzipitation und Komplementablenkung geprüft.

1) Alle biologischen Reaktionen führte ich im Institut von Dr. Ph. Blumenthal aus, wofür ich Herrn Dr. Ph. Blumenthal meinen besten Dank ausspreche.



Die Agglutinationsreaktion wurde nach der gewöhnlichen Methode makroskopisch ausgeführt. Die Beobachtung dauerte 3 Stunden bei 37° C. Alle 3 Proben ergaben negative Resultate, selbst bei einer Verdünnung von 1:10.

Die Komplementablenkungsreaktion wurde das erste Mal nach Bordet und Gengou mit der Emulsion einer abgetöteten Kultur als Antigen ausgeführt. Dabei stellte sich jedoch heraus, daß ein derartiges Antigen an und für sich die Hämolyse hemmt; deshalb gingen wir zu den nach Altmann und Schultz<sup>1)</sup> hergestellten Antiforminantigenen über. Um die Identität unseres Pilzes mit *Actinomyces* und anderen *Streptothrix*-Arten klarzustellen, führten wir stets 4 parallele Versuchsreihen aus mit einem Antigen aus unserem Pilze und mit den Antigenen aus den im Pathologisch-anatomischen Institute befindlichen Kulturen von *Actinomyces hominis*, *Streptothrix farcinicus* und *Streptothrix Eppingeri*.

Zum Auflösen der Kulturen benutzten wir eine 2-proz. Antiforminlösung, und nahmen das Auflösen bei 75° C vor, um eine gesättigte Lösung zu gewinnen. In das Reagensgläschen mit Antiformin wurde die Kultur allmählich mit einem Platinspatel getan, bis die Lösung ein wenig trübe wurde. Dann wurde allmählich 2-proz. Antiformin bis zur vollständigen Aufhellung der Lösung hinzugefügt. Nach der Auflösung wurde das Extrakt mit 10-proz. Schwefelsäure neutralisiert und die Chlorreste mit Natrium sulfurosum entfernt. Dabei konnten wir feststellen, daß die Auflösung des *Actinomyces* viel schneller vor sich geht, als die der *Streptothrix*. Anfangs führten wir die Reaktion mit konstanter Serumdose (0,05 bei dem Gesamtvolumen von 1,3) und absteigenden Antigendosen aus. Darauf nahmen wir eine konstante Antigendose (die größte, an und für sich die Hämolyse nicht hemmende) und absteigende Serumdosen. Als hämolytisches System benutzten wir eine 2,5-proz. Emulsion von frisch abgewaschenen Hammelkomplementerythrocyten in 0,85-proz. NaCl, homologes Immunserum vom Kaninchen und frisches Meerschweinchenserum. Die Menge des hämolytischen Serums betrug zwei Ambozeptoreinheiten, die des Komplements zwei auflösende Dosen. Die Reagensgläschen wurden eine Stunde bei 37° C gelassen, worauf das hämolytische Serum und das Blut zugesetzt wurde. Die Reagensgläschen blieben 2 Stunden lang bei 37° C und dann 20 Stunden auf Eis.

Alle diese Versuche ergaben negative Resultate. Bei der Anwendung verschiedener Kulturen als Antigene wurde kein Unterschied bemerkt.

Als Beispiel führen wir das Protokoll eines Experimentes an:

Fünf Reihen von Reagensgläschen wurden mit absteigenden Dosen von inaktiviertem (30 Minuten bei 56° C) Serum des Versuchskaninchens beschickt, zur ersten Reihe fügte man 0,1—0,85-proz. NaCl (Kontrolle), zu den übrigen je 0,1-proz. Antiforminextrakt aus unserer *Streptothrix*, aus *Streptothrix Eppingeri*, aus *Streptothrix farcinici* und aus *Actinomyces hominis* hinzu, in jedes Reagensgläschen wurde 0,05 ccm Meerschweinchenserum eingegossen und das Gesamtvolumen durch Zusatz von 0,85-proz. NaCl-Lösung auf 0,7 ccm gebracht. Die Mischung wurde für eine Stunde bei 37° C belassen. Nach Verlauf dieser Stunde fügte man in jedes Gläschen je 0,5 ccm einer 2,5-proz. Emulsion von Hammelerythrocyten und 0,0005 ccm inaktiviertes hämolytisches Kaninchenserum hinzu. Die eingetretene Hämolyse ist in der beigefügten Tabelle bezeichnet nach 2-stündigem Verweilen im Brutschrank und 20-stündigem auf Eis.

1) Zeitschr. f. Immun.-Forsch., Bd. 3.

Menge des Serums vom Versuchskaninchen	Eingetretene Hämolyse bei den Antigenen				
	0,1 bis 0,85-proz. NaCl	0,1 ccm Antiforminextrakt aus unserer Streptothrix	0,1 ccm Antiforminextrakt aus Streptothrix Eppingeri	0,1 ccm Antiforminextrakt aus Streptothrix farcinici	0,1 ccm Antiforminextrakt aus Actinomyces hominis
0,05 ccm	stark	stark	stark	stark	stark
0,025 "	"	"	"	"	"
0,015 "	fast komplett	"	"	"	"
0,01 "	komplett	fast komplett	fast komplett	fast komplett	fast komplett
0,005 "	"	komplett	komplett	komplett	komplett
0,003 "	"	"	"	"	"
0 "	"	"	"	"	"

Wie aus der beigefügten Tabelle ersichtlich, gab das angeführte Experiment in allen 4 Reihen (im Vergleich mit der Kontrollreihe) eine geringfügige Hemmung der Hämolyse, die für alle benutzten Antigene die gleiche war. Doch ist sie so gering, daß es unmöglich erscheint, die Reaktionsresultate für positiv zu erklären.

Die Präzipitinreaktion haben wir ebenfalls mit Antiforminantigenen (Ueberschichtung nach Schereschewsky) ausgeführt, doch ebenfalls mit negativem Resultate.

\* \* \*

Ehe wir das oben Gesagte zusammenfassen, müssen wir einen Umstand erwähnen, welcher einen in unserer Untersuchung vorhandenen Widerspruch erklärt.

Die Sektion wurde in unserem Falle am 20. September 1908 von Dr. W. A. Iwanow ausgeführt, der auch die Untersuchung einleitete. Der vorzeitige Tod erlaubte ihm nicht, seine Untersuchung zu vollenden. Wir aber haben die Bearbeitung des Materials erst 1½ Jahre nach der Sektion angefangen. Diese Zeit über wurden die Organe im Museum teils in der Flüssigkeit von Prof. Melnikow-Raswedenkow, teils in 80-proz. Alkohol konserviert. Dadurch erklären wir den Umstand, daß uns die Färbung des Pilzes in Schnitten nach Gram nicht gelungen ist, obgleich er in den Kulturen sich nicht entfärbte. Daß nach langem Verweilen der Schnitte in 80-proz. Alkohol die Bakterien ihre Fähigkeit, sich nach Gram zu färben, verlieren, ist eine allbekannte Tatsache.

Oben bezeichneten wir den von uns gezüchteten Pilz als Streptothrix. Der von Chiari gemachte Versuch, derartige Pilze mit echtem Actinomyces zu identifizieren, scheint uns nicht genügend begründet. Seine Erklärung, daß der Actinomyces im Gehirne öfters keine typischen Drusen bildet, sondern sich in Form von isolierten Fäden lagert, würde von Bedeutung sein, wenn es ihm gelungen wäre, Drusen auch in den inneren Organen nachzuweisen. Doch im Falle von Chiari wurden letztere nicht untersucht. In unserem Falle jedoch besaß der Pilz im Gehirn wie in der Lunge das gleiche Aussehen. Darum scheint es uns unmöglich, ihn mit echtem Actinomyces zu identifizieren. Die von Berestnew vorgeschlagene Bezeichnung „atypische Aktinomykose“ hat sich nicht eingebürgert, und wir ziehen die von Cohn in die bakteriologische Nomenklatur eingeführte Bezeichnung „Streptothrix“ vor. Diese Bezeichnung mag vielleicht weniger richtig sein; sie scheint uns jedoch wegen ihrer Verbreitung verständlicher zu sein.

Der in unserem Falle gezüchtete Pilz besitzt beide charakteristischen Merkmale von Streptothrix; echte Verästelung und keine Drusenbildung.

Die Frage jedoch, ob dieser Pilz mit den von anderen Autoren aus Gehirnabszessen isolierten *Streptothrix*-Arten identisch sei, ist etwas schwerer zu entscheiden, wie auch die Frage nach der Identität aller dieser Arten.

Das Wachstum aller dieser *Streptothrix*-Arten auf Nährböden weist viel Gemeinsames auf. Der Hauptunterschied besteht in der Pigmentbildung. Ein Teil der beschriebenen Pilze bildet keinen Farbstoff, die anderen bilden verschiedene Pigmente. Freilich ist die Bildung dieses oder jenes Farbstoffes ein zu unbedeutendes Kriterium. Wesentlichere Dienste vermöchten wohl die Versuche mit anaërober Züchtung zu erweisen. Unsere *Streptothrix* erwies sich als fakultativ anaërob; ohne Sauerstoffzutritt entwickelte sie sich nur bei Zimmertemperatur und ging bei 37° C zugrunde. Die Frage nach der Anaërobiose ist am ausführlichsten von Berestnew bearbeitet, dessen Pilz auch zu den fakultativ anaëroben gerechnet werden muß; Eppinger, Engelhardt und Löhlein und Horst zählen ihre *Streptothrix*-Arten zu den streng aëroben, doch fehlen bei ihnen Angaben, ob sie anaërobe Kulturen bei Zimmertemperatur zu erzielen versucht hätten, so daß die Frage nach der fakultativen Anaërobiose in ihren Arbeiten auch nicht völlig entschieden ist. Bei den übrigen Autoren haben wir keine Angaben über Versuche der anaëroben Züchtung gefunden.

Ein ziemlich wichtiges Kriterium ist nach unserer Meinung die Eigenbewegung des Pilzes. Nicht alle Arbeiten aber enthalten Angaben darüber. Beweglich waren die *Streptothrix*-Arten von Eppinger und Horst. Die Unbeweglichkeit betont Löhlein sowohl in seiner selbständigen Arbeit als auch in der mit Engelhardt ausgeführten. Unsere *Streptothrix* hat sich als unbeweglich bewiesen.

Was die morphologischen Eigentümlichkeiten der verschiedenen *Streptothrix*-Arten betrifft, so bieten die meisten Pilze keine besonderen unterscheidenden Merkmale dar. In dieser Beziehung kann man von der Länge der Fäden, sowie von der Neigung zur Stäbchen- und Kolbenbildung sprechen. Unsere *Streptothrix* zerfiel sehr früh in Stäbchen, und um Fadenkulturen zu erhalten, mußten wir die Plattenkulturmethode anwenden. Mit dieser Methode gelang es, aus der Kultur einzelner Exemplare habhaft zu werden, welche die Fähigkeit, in langen verästelten Fäden zu wachsen, bewahrt hatten. Doch bei der weiteren Ueberimpfung solch einer Kolonie zerfiel sie wiederum schnell in Stäbchenformen. Was die Bildung von Endanschwellungen anbetrifft, so besaß unsere *Streptothrix* die Fähigkeit, an den Enden der langen Fäden kolbige Anschwellungen zu bilden. Im Organismus bildete sie kleine, sternförmige Figuren, welche an die von Eppinger in seinen Zeichnungen dargestellten gemahnten, doch viel kleiner waren.

Von den tinktoriellen Eigentümlichkeiten der bei der Affektion des Zentralnervensystems reingezüchteten *Streptothrix*-Arten hebt die Mehrzahl der Autoren ihre Fähigkeit hervor, sich nach Gram zu färben. Eine Ausnahme bildet nur die *Streptothrix* von Pribytkow und Maloletkow. Leider gelang es den Autoren nicht, Reinkulturen zu gewinnen, und die Arbeit enthält keine direkten Angaben über die Zeit, die zwischen der Autopsie und der Färbung der Präparate verflossen ist. (Außerdem haben die Autoren die Weigertsche Modifikation der Gramschen Methode angewandt). Und wie unser Fall beweist, kann *Streptothrix* bei der Konservierung der Stücke ihre Gram-Färbungsfähigkeit leicht verlieren.

Die andere, weniger konstante tinktorielle Eigentümlichkeit der Streptothrix-Arten ist die Säurefestigkeit, welche Berestnew wohl fälschlich für eine sehr konstante hält. Zu den gar nicht säurefesten Pilzen gehören neben unserer Streptothrix die von Engelhardt und Löhlein; Chiari und Sternberg machen keine Angaben darüber. Der Pilz von Löhlein besaß relative Säurefestigkeit. Alle anderen wiesen vollkommene Säurefestigkeit auf.

Was die Pathogenität der Streptothrix-Kulturen betrifft, so heben die meisten Autoren, welche an Tieren experimentiert haben, die Empfänglichkeit gewöhnlicher Versuchstiere für sie hervor, wobei die Tiere zweierlei Veränderungen darboten: Bald Granulombildung (Eppinger, Engelhardt und Löhlein, Horst, Löhlein), bald chronische Eiterungen (Berestnew, Sternberg). In dieser Beziehung standen wir vor höchst ungünstigen Bedingungen, da die in unserem Falle von Dr. Skwortzow gewonnenen Kulturen, bevor sie in unsere Hände gelangten, 1½ Jahre lang Tieren nicht verimpft worden waren und während dieser Zeit ihre Virulenz wohl verloren hatten. Im Tierorganismus entwickelten sie sich nicht, und es ist uns niemals gelungen, eine Reinkultur aus dem Versuchstiere zu erhalten. (Zu analogen Resultaten kam auch Sternberg, obgleich er frische Kulturen überimpfte). Es gelang auch niemals, sie in den Ausstrichen zu entdecken.

In Anbetracht der großen Menge von Involutionsformen muß man annehmen, daß die im Versuch No. II nachgewiesenen Stäbchen die der Maus eingespritzten und nicht in ihrem Organismus entwickelten darstellten. Trotz dieser ungünstigen Bedingungen ist es uns mit unseren Experimenten doch einiges klarzulegen gelungen. Als empfänglich erwiesen sich Mäuse, Kaninchen und Meerschweinchen. Weiße Ratten reagierten auf die Injektion nicht. Die Versuche mit intravenöser Infektion blieben resultatlos. (Das Zugrundegehen der Maus im Versuch No. I ist wohl durch einfache Vergiftung mit der allzu großen Dosis der eingespritzten Kultur zu erklären. Das wird durch den Tod der Maus im Versuch No. II bei subkutaner Injektion derselben Dosis bestätigt.) Bei subkutaner Injektion gingen die Tiere nicht zugrunde, und es entwickelten sich bei ihnen chronische Eiterungen. Das gleiche Resultat wurde bei der intracerebralen Infektion beobachtet (Versuch No. IX). Das Auftreten von Eiterung ist angesichts der Avirulenz der Kulturen durch Endotoxinbehandlung zu erklären, was im Versuch No. II seine Bestätigung findet. Somit sind die Resultate unserer Experimente als identisch mit denen von Berestnew und Sternberg anzusehen, obgleich die in unserem Falle isolierte Streptothrix sich bezüglich ihrer tinktoriellen Merkmale von der Berestnewschen unterscheidet.

Wertvolle Dienste bei der Lösung der Frage nach der Identität verschiedener Streptothrix-Varietäten und ihren Beziehungen zu Actinomyces und Cladothrix könnten die biologischen Reaktionen leisten. Leider sind die Immunitätsverhältnisse bei Aktinomykose und den ihr nahestehenden Krankheiten gegenwärtig sehr wenig erforscht. In keiner der von uns zitierten Arbeiten wurden biologische Reaktionen ausgeführt. In unserem Falle ergaben sie ein negatives Resultat.

Demnach ist die Frage nach den Beziehungen zwischen den von verschiedenen Autoren bei Affektionen des Zentralnervensystems isolierten Streptothrix-Arten gegenwärtig sehr schwer zu lösen. Dazu ist weitere planmäßige Erforschung ihrer Morphologie und ihrer tinktoriellen Eigenschaften, ihres Wachstums auf Nährböden (hauptsächlich

Versuche mit anaërober Züchtung bei verschiedenen Temperaturen), sowie der Immunitätsverhältnisse bei Aktinomykose und den ihr nahestehenden Erkrankungen von nöten.

Endlich sind noch einige Worte über die Infektionswege bei den Streptothrichosen des Zentralnervensystems zu sagen. In den meisten Arbeiten, die wir kennen gelernt haben, wird der Zusammenhang solcher Affektionen des Zentralnervensystems mit den Streptothrichosen der Lunge und der Bronchialdrüsen betont. Besonders häufig werden sie bei Bronchiektasieen angetroffen. Dieselben Infektionswege stehen auch in unserem Falle außer allem Zweifel.

Zum Schlusse ist es mir eine angenehme Pflicht, meinem Lehrer, dem hochverehrten Prof. M. N. Nikiforow, für die Ueberlassung des Materials und die Anfertigung der Mikrophotogramme meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

*Nachdruck verboten.*

## Wirkung der Fette auf das Tollwutvirus.

Von Prof. Dr. **Claudio Fermi**,

Vorstand des Hygienischen und Antirabischen Institutes an der Kgl. Universität Sassari.

Zur Fortsetzung meiner Untersuchungen über den Einfluß einer langen Reihe chemischer Stoffe auf das fixe Virus habe ich das Studium der Einwirkung einiger Fette aufgenommen.

Die wichtige Arbeit von Manfredi, der sich als erster mit der Fetteinwirkung auf Bakterien beschäftigte, und die weiteren Beiträge von Binaghi, Guargena und Lombardo-Pellegrino haben eine ausgeprägte attenuierende und bakterientötende Wirkung der Fette bewiesen. Es hat daher einiges Interesse, das Verhalten dieser Stoffe zu einem Vertreter des Protistenreiches, und zwar zum Tollwutvirus, zu prüfen.

Die Untersuchung wurde in folgender Anordnung ausgeführt:

- I. Fetteinwirkung auf das fixe Virus.
    1. Subkutane Impfung des fixen. mit Fett gemischten Virus.
    2. Subkutane Impfung des Waschwassers der vorstehenden Gemische.
    3. Subkutane Impfung der einzelnen Fette und nach 5 resp. 30 Minuten oder 5 Stunden Impfung des fixen Virus an derselben Hautstelle.
    4. Subkutane Injektion des fixen Virus und nach 5 resp. 30 Minuten oder 5 Stunden Impfung der einzelnen Fette an derselben Hautstelle.
    5. Subdurale Injektion des Virusfettgemisches.
    6. Subdurale Injektion der Waschflüssigkeit der vorstehenden Gemische.
  - II. Fetteinwirkung auf das Immunisationsvermögen des Tollwutvirus.
- In derselben Anordnung führe ich hier die Versuche an.

### I. Fetteinwirkung auf das fixe Virus.

1. Subkutane Injektion des fixen, mit Fett gemischten Virus.

Versuch. 5 g fixes Virus werden mit 5 ccm sterilen Fettes zerrieben und innig vermischt; nach 30 resp. 5 Minuten langem Stehen bei 29° C wird 0,5 ccm Gemisch Ratten subkutan geimpft. Kontrollen wurden mit demselben Virus injiziert.

Datum 1910	Zahl und Art des Versuchstieres	Impfungs- weg	Impfungsmaterial	Ergebnis	
				Anfang der Paralyse	Todeseintritt
Mischung 30 Minuten stehen lassen.					
9. Juli dgl.	1 Ratte dgl.	subkutan	Fixes Virus + Lanolin dgl. + "		lebt
"	"	"	" + Olivenöl		"
"	"	"	" + "		"
"	"	"	" + Vasolin		"
"	"	"	" + "		"
"	"	"	" + Paraffinöl	15. Juli, 7 Uhr vorm.	16. Juli, 7 Uhr vorm.
"	"	"	" + "	lebt	lebt
Mischung 5 Minuten stehen lassen.					
1. Juni dgl.	1 Ratte dgl.	subkutan	Fixes Virus + Lanolin dgl. + "		lebt
8. Mai dgl.	"	"	" + Paraffin		"
1. Juni dgl.	"	"	" + "		"
"	"	"	" + Vaseline		"
"	"	"	" + "		"
"	"	"	" + Paraffinöl		"
"	"	"	" + "		"
"	"	"	Kontrolle (fixes Virus allein)	8. Juni, 8 Uhr vorm.	8. Juni, 7 Uhr nachm.
10. Aug. dgl.	"	"	Fixes Virus + Lanolin dgl. + "		lebt
"	"	"	" + Vaseline		"
"	"	"	" + "		"
"	"	"	" + Paraffinöl		"
"	"	"	" + "		"
"	"	"	Kontrolle (fixes Virus allein)	16. Aug., 7 Uhr vorm.	17. Aug., 4 Uhr nachm.
"	"	"	dgl.	dgl.	dgl.

Ergebnisse. 1) Das mit Lanolin, Olivenöl, Vaseline, Paraffinöl 5 oder auch 30 Minuten bei 29° C in Berührung gestandene fixe Virus war auf subkutanem Wege beinahe unschädlich, denn es überlebten 21 von 22 injizierten Ratten. Das einzige gestorbene Tier war mit Paraffinölmischung behandelt worden.

2) Es bleibt zu untersuchen, ob die Fette das fixe Virus total zerstört oder lediglich attenuiert, d. h. seiner Wirksamkeit auf subkutanem Wege durch Absorption beraubt, oder irgendwie festgehalten hatten, oder ob die angewandten Fette die Schutz- und Angriffsmittel der Gewebe (Tötung, Attenuation, Abschwächung der Penetrationsfähigkeit des Virus in Nervenzellen usw.) gesteigert hatten.

3) Die einzelnen Fette entfalten die gleiche lyssizide und direkte oder indirekte Attenuationswirkung, nur das Paraffinöl war etwas weniger wirksam.

## 2. Subkutane Impfung der Waschflüssigkeit des vorstehenden Gemisches.

Versuch. 1 g fixes Virus wird mit 5 ccm sterilen Fettes zerrieben und innig vermischt; nach 30 Minuten resp. 24 Stunden schüttelt man das Gemisch mit 10 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung, um das Virus vom Fett zu trennen, dann impft man 2 ccm dieses Auszuges Ratten und Meerschweinchen subkutan ein.



Datum 1910	Zahl und Art der Versuchs- tiere	Imp- fungs- weg	Impfungsmaterial	Ergebnis	
				Anfang der Paralyse	Todeseintritt
Extraktion des Virus nach 30 Minuten.					
9. Juli	1 Ratte	sub- kutan	Waschflüssigkeit des Viruslanolिंगemisches	lebt	
dgl.	dgl.	dgl.	" "	"	
"	"	"	" " Virusolivenölgemisches	"	
"	"	"	" " Virusvaselingemisches	"	
"	"	"	" " Virusparaffinölgemisches	19. Juli, 7 Uhr vorm.	20. Juli, 7 Uhr vorm.
"	"	"	" "	dgl.	dgl.
Extraktion des Virus nach 24 Stunden.					
11. Aug.	1 Ratte	sub- kutan	Waschflüssigkeit des Viruslanolिंगemisches	lebt	
dgl.	dgl.	dgl.	" "	"	
"	"	"	" " Virusolivenölgemisches	† nach 48 Std. lebt	
"	"	"	" " Virusparaffingemisches	† nach 48 Std. lebt	
"	"	"	" " Virusvaselingemisches	"	
"	"	"	" " Virusparaffinölgemisches	† nach 24 Std. lebt	
"	"	"	" " Viruslanolिंगemisches	"	
"	1 Meer- schwein- chen	"	" "	"	
"	dgl.	"	" " Virusolivenölgemisches	"	
"	"	"	" " Virusparaffingemisches	† nach 48 Std. lebt	
"	"	"	" " Virusvaselingemisches	"	
"	"	"	" " Virusparaffinölgemisches	† nach 48 Std. lebt	
"	"	"	" "	"	

**Ergebnisse.** 1) Unter 29 Tieren (19 Ratten und 10 Meer-schweinchen), die mit der Waschflüssigkeit (physiologischer Lösung) des Gemisches von fixem Virus + Fett geimpft worden waren, starb ein einziges an Tollwut, und zwar hier auch eins der beiden mit der Waschflüssigkeit der Paraffinölmischung behandelten.

2) Fette haben das Virus festgehalten oder zerstört oder seine Wirkung auf subkutanem Wege aufgehoben.

3) Bei diesem Versuche wurde ebenfalls kein Unterschied in der Wirkung der einzelnen Fette beobachtet; Paraffinöl war aber wiederum weniger wirksam.

### 3. Subkutane Impfung des Fettes und nachherige Injektion des Virus an derselben Hautstelle.

**Versuch.** Man impft einer Ratte 1 ccm Fett und nach 5 resp. 30 Minuten oder 5 Stunden 0.5 ccm fixes, 1-proz. Virus an derselben Stelle subkutan ein.

Datum 1910	Zahl und Art der Versuchs- tiere	Impfungs- weg	Impfungsmaterial	Ergebnis	
				Anfang der Paralyse	Todeseintritt

## Virusinjektion 5 Minuten nach der Fettimpfung.

7. Juni	1 Ratte	subkutan	Lanolin,	dann fixes Virus	lebt
dgl.	dgl.	"	"	dgl.	"
17. Aug.	"	"	"	"	"
dgl.	"	"	"	"	"
7. Juni	"	"	Olivenöl,	"	"
dgl.	"	"	"	"	"
17. Aug.	"	"	"	"	"
dgl.	"	"	"	"	"
7. Juni	"	"	Paraffin,	"	"
dgl.	"	"	"	"	"
17. Aug.	"	"	"	"	"
dgl.	"	"	"	"	"
7. Juni	"	"	Vaselin,	"	"
dgl.	"	"	"	"	"
17. Aug.	"	"	"	"	"
dgl.	"	"	"	"	"
7. Juni	"	"	Paraffinöl,	"	"
dgl.	"	"	"	"	"
17. Aug.	"	"	"	"	"
dgl.	"	"	"	"	"

## Virusinjektion 30 Minuten nach der Fettimpfung.

8. Okt.	1 Ratte	subkutan	Lanolin,	dann fixes Virus	lebt
dgl.	dgl.	"	"	dgl.	"
20. Juni	"	"	Olivenöl,	"	26. Juni, 7 Uhr vorm. dgl.
dgl.	"	"	"	"	27. Juni, 7 Uhr vorm. dgl.
"	"	"	"	"	26. Juni, 7 Uhr nachm.
8. Okt.	"	"	"	"	lebt
dgl.	"	"	"	"	"
20. Juni	"	"	Vaselin,	"	26. Juni, 7 Uhr vorm. dgl.
dgl.	"	"	"	"	27. Juni, 7 Uhr vorm. dgl.
"	"	"	"	"	"
8. Okt.	"	"	"	"	lebt
dgl.	"	"	"	"	"
"	"	"	Paraffinöl,	"	"
"	"	"	"	"	"
"	"	"	Paraffin,	"	"
"	"	"	"	"	"

## Virusinjektion 5 Stunden nach der Fettimpfung.

20. Juni	1 Ratte	subkutan	Olivenöl,	dann fixes Virus	26. Juni, 7 Uhr vorm. dgl.	27. Juni, 7 Uhr vorm. dgl.
dgl.	dgl.	"	"	dgl.	"	26. Juni, 7 Uhr nachm.
"	"	"	"	"	"	27. Juni, 7 Uhr vorm. dgl.
"	"	"	Vaselin,	"	"	"
"	"	"	"	"	"	"
8. Juni	"	"	"	"	16. Okt., 7 Uhr vorm.	16. Okt., 7 Uhr nachm.
20. Juni	"	"	Kontrolle, 1-proz. Virus allein	dgl.	26. Juli, 7 Uhr vorm.	27. Juni, 7 Uhr vorm.

Ergebnisse. 1) Fand die Injektion 0,5 ccm fixen, 1-proz. Virus an derselben Hautstelle statt, wo vor 5 Minuten 1 ccm Fett eingepft worden war, so überlebten alle 20 Ratten, während die mit fixem, bis 1:30000 verdünntem Virus geimpften Kontrolltiere starben.

2) Fand die Virusimpfung  $\frac{1}{2}$  Stunde nach der Fettimpfung statt, so überlebten 10 von 16 Ratten. Die 6 Todesfälle waren zur Hälfte unter den 5 mit Olivenöl, die übrigen unter den 5 mit Vaseline geimpften Tieren zu verzeichnen.

3) Verschoß man die Virusimpfung um 5 Stunden nach der Fettimpfung, so starben alle 6 Tiere ohne Verlängerung der Inkubationszeit.

#### 4. Subkutane Injektion des fixen Virus und nachherige Fettimpfung an derselben Hautstelle.

Versuch. Ratten werden mit 0,5 ccm fixen Virus und nach 5 resp. 30 Minuten oder 5 Stunden an derselben Hautstelle mit 1 ccm sterilen Fettes geimpft.

Datum 1910	Art und Zahl der Versuchs- tiere	Impfungs- weg	Impfungsmaterial	Ergebnis	
				Anfang der Paralyse	Todeseintritt
Fettimpfung 5 Minuten nach der Virusinjektion.					
7. Juni dgl.	1 Ratte dgl.	subkutan	Fixes Virus, dann Lanolin		lebt
17. Aug. dgl.	"	"	dgl. " "		"
7. Juni dgl.	"	"	" " Olivenöl		"
17. Aug. dgl.	"	"	" " "		"
7. Juni dgl.	"	"	" " Paraffin		"
17. Aug. dgl.	"	"	" " "		"
7. Juni dgl.	"	"	" " Vaseline		"
17. Aug. dgl.	"	"	" " "		"
7. Juni dgl.	"	"	" " Paraffinöl		"
17. Aug. dgl.	"	"	" " "		"
Fettimpfung 30 Minuten nach der Virusinjektion.					
8. Okt. dgl.	1 Ratte dgl.	subkutan	Fixes Virus, dann Lanolin		lebt
"	"	"	dgl. " Olivenöl		"
20. Juni dgl.	"	"	" " "	27. Juni, 7 Uhr vorm. dgl.	28. Juni, 7 Uhr vorm. dgl.
"	"	"	" " Vaseline	"	"
"	"	"	" " "	"	"
8. Okt. dgl.	"	"	" " "	"	lebt
"	"	"	" " Paraffinöl		"
"	"	"	" " Paraffin		"
"	"	"	" " "		"

Datum	Art und Zahl der Versuchs- tiere	Impfungs- weg	Impfungsmaterial	Ergebnis	
				Anfang der Paralyse	Todeseintritt
1910					
Fettimpfung 5 Stunden nach der Virusinjektion.					
20. Juni	1 Ratte	subkutan	Fixes Virus, dann Olivenöl	27. Juni, 7 Uhr vorm.	28. Juni, 7 Uhr vorm.
dgl.	dgl.	"	dgl. " "	dgl.	dgl.
"	"	"	" " "	"	"
"	"	"	" " Vaseline	"	"
"	"	"	" " "	"	"
8. Okt.	"	"	" " "	"	"
	"	"	Kontrolle, 1-proz. Virus allein	16. Okt., 7 Uhr vorm.	16. Okt., 7 Uhr nachm.
7. Juni	"	"	dgl.	13. Juni, 7 Uhr vorm.	13. Juni, 7 Uhr nachm.
17. Aug.	"	"	"	23. Aug., 7 Uhr vorm.	24. Aug., 12 Uhr vorm.
20. Juni	"	"	"	27. Juni, 7 Uhr vorm.	27. Juni, 7 Uhr nachm.

Ergebnisse. 1) Ging die subkutane Injektion 1-proz. Virus der Fettimpfung 5 Minuten voraus, so überlebten alle 20 Ratten, während die Kontrollen unverzüglich starben.

2) Ging die Virusimpfung 30 Minuten voraus, so überlebten 10 von 16 Ratten, während 3 von den 5 mit Olivenöl, 3 von den 5 mit Lanolin nachgeimpften Tieren starben.

3) Fand die Fettimpfung 5 Stunden nach der Virusimpfung statt, so gingen alle 6 Ratten zugrunde.

#### 5. Subdurale Injektion des Virusfettgemisches.

Versuch. 5 g fixen Virus werden mit 5 ccm sterilen Fettes zerrieben und innig gemischt; nach 5 Tagen resp. 24 Stunden oder 5 Minuten wird  $\frac{1}{4}$  ccm dieses Gemisches Hunden und Meerschweinchen subdural injiziert. Kontrollen wurden mit dem gleichen Virus subdural geimpft.

Datum 1910	Art und Zahl der Versuchs- tiere	Impfungs- weg	Impfungsmaterial	Ergebnis	
				Anfang der Paralyse	Todeseintritt
Virus und Fett 5 Minuten in Berührung gelassen.					
8. Okt.	1 Hund	subdural	Fixes Virus + Lanolin	lebt	
20. Juni	dgl.	"	dgl. + Olivenöl	26. Juni, 7 Uhr vorm.	27. Juni, 7 Uhr vorm.
dgl.	"	"	" + "	dgl.	dgl.
20. Aug.	"	"	" + "	lebt	
dgl.	"	"	" + "	"	
8. Okt.	"	"	" + "	"	
9. Okt.	"	"	" + "	"	
dgl.	"	"	" + "	"	
20. Juni	"	"	+ Vaseline	26. Juni, 7 Uhr vorm.	27. Juni, 7 Uhr vorm.
dgl.	"	"	" + "	dgl.	dgl.
8. Okt.	"	"	" + "	lebt	
20. Aug.	"	"	+ Paraffinöl	"	
dgl.	"	"	" + "	"	
8. Okt.	"	"	" + "	"	
9. Okt.	"	"	" + "	"	
dgl.	"	"	" + "	"	
8. Okt.	"	"	+ Paraffin	"	

Datum 1910	Art und Zahl der Versuchs- tiere	Impfungs- weg	Impfungsmaterial	Ergebnis	
				Anfang der Paralyse	Todeseintritt
8. Okt.	1 Meer- schwein- chen	subdural	Fixes Virus + Lanolin	15. Okt., 7 Uhr vorm.	16. Okt., 7 Uhr vorm.
dgl.	dgl.	"	dgl. + Olivenöl	dgl.	dgl.
"	"	"	" + Vaseline	17. Okt., 7 Uhr vorm.	18. Okt., 7 Uhr vorm.
"	"	"	" + Paraffinöl	15. Okt., 7 Uhr vorm.	16. Okt., 7 Uhr vorm.
"	"	"	" + Paraffin	dgl.	dgl.
Virus und Fett 24 Stunden in Berührung gelassen.					
14. Juli	1 Hund	subdural	Fixes Virus + Lanolin	lebt	
dgl.	dgl.	"	dgl. + Olivenöl	Stirbt nach 5 Tagen, aber nicht an Tollwut	
"	"	"	" + Paraffin		
"	"	"	" + Vaseline	Gehirn- abszeß	20. Juli, 7 Uhr vorm.
"	"	"	Kontrolle, fixes Virus allein	13. Juli, 9 Uhr vorm.	14. Juli, 7 Uhr vorm.
"	"	"	dgl.	dgl.	dgl.
Virus und Fett 5 Tage in Berührung gelassen.					
9. Juli	1 Hund	subdural	Fixes Virus + Lanolin	lebt	
dgl.	dgl.	"	dgl. + Olivenöl	Stirbt nach 5 Tagen infolge eines Gehirnabszesses	
"	"	"	" + Paraffin		
"	"	"	" + Vaseline	dgl.	dgl.

Ergebnisse. Unter 27 mit Virus und Fett subdural geimpften Hunden überlebten 17. Unter den mit der 5 Tage resp. 24 Stunden gestandenen Virusfettmischung geimpften Hunden gingen 8, aber nicht an Tollwut, zugrunde, während 4 von den 16 mit der 5 Minuten gestandenen Virusfettimpfung geimpften Tieren starben.

#### 6. Subdurale Injektion der Waschflüssigkeit des Virusfettgemisches.

Versuch. 1 g fixen Virus wird mit 5 ccm sterilen Fettes zerrieben und innig gemischt; nach 24 Stunden schüttelt man das Gemisch mit 10 ccm steriler physiologischer Lösung und impft 2 ccm Waschflüssigkeit Hunden subdural ein.

Datum 1910	Art und Zahl der Versuchs- tiere	Impfungs- weg	Impfungsmaterial	Ergebnis	
				Anfang der Paralyse	Todeseintritt
12. Aug.	1 Hund	subdural	Waschflüssigkeit des Virus- lanolingemisches	16. Aug., 7 Uhr vorm.	17. Aug., 7 Uhr vorm.
dgl.	dgl.	"	Waschflüssigkeit des Virus- olivenölgemisches	dgl.	dgl.
"	"	"	Waschflüssigkeit des Virus- paraffingemisches	"	"
"	"	"	Waschflüssigkeit des Virus- vaselingemisches	"	"
"	"	"	Waschflüssigkeit des Virus- paraffinölgemisches	"	"

Datum 1910	Art und Zahl der Versuchs- tiere	Impfungs- weg	Immunis- ations- beginn	Impfungs- zahl täglich	Dauer Tage	Impfungs- menge einmalig	Immunisations- material	Impfungs- menge total	Anfang der Paralyse	Ergebnis Todeseintritt
9. Juni dgl.	1 Ratte dgl.	subkutan	9. Juni	2	15	2 ccm	Virusfett- emulsion dgl.	30 ccm	23. Juni, 7 Uhr vorm. dgl.	24. Juni, 7 Uhr vorm. dgl.
"	"	"	dgl.	2	15	2 "	"	30 "	"	"
"	"	"	"	2	15	2 "	"	30 "	"	"
10. Nov.	"	"	10. Nov.	2	15	2 "	"	30 "	25. Nov., 4 Uhr nachm.	26. Nov., 7 Uhr vorm.
dgl.	"	"	dgl.	1	15	1 "	"	30 "	29. Nov., 7 Uhr vorm.	29. Nov., 6 Uhr nachm.
"	"	"	"	1	15	1 "	"	30 "	1. Dez., 8 Uhr vorm.	2. Dez., 8 Uhr vorm.
"	"	"	"	2	15	2 "	"	30 "	"	"
17. Nov. dgl.	"	"	17. Nov.	2	15	2 "	"	30 "	"	"
"	"	"	dgl.	2	15	2 "	"	30 "	"	"
"	"	"	"	2	10	2 "	"	20 "	"	"
"	"	"	"	2	10	2 "	"	20 "	"	"
"	"	"	"	2	10	2 "	"	20 "	"	"
"	"	"	"	2	10	2 "	"	20 "	"	"
"	"	"	"	2	10	2 "	"	20 "	"	"
10. Nov.	"	"	"	—	—	—	Kontrolle	—	2. Dez., 8 Uhr vorm.	3. Dez., 7 Uhr vorm.
17. Nov.	"	"	—	—	—	—	"	—	25. Nov., 4 Uhr nachm.	26. Nov., 7 Uhr vorm.
10. Nov.	"	"	10. Nov.	3	15	1 ccm	Impfstoff nach Fermi dgl.	30 ccm	30. Nov., 7 Uhr vorm.	30. Nov., 7 Uhr nachm.
dgl.	"	"	dgl.	3	15	1 "	"	30 "	"	"
"	"	"	"	3	15	1 "	"	30 "	"	"
"	"	"	"	3	15	1 "	"	30 "	"	"
17. Nov. dgl.	"	"	17. Nov.	3	10	1 "	"	20 "	"	"
"	"	"	dgl.	3	10	1 "	"	20 "	"	"
"	"	"	"	3	10	1 "	"	20 "	"	"
"	"	"	"	3	10	1 "	"	20 "	"	"
"	"	"	"	3	10	1 "	"	20 "	"	"
"	"	"	"	3	10	1 "	"	20 "	"	"
"	"	"	"	3	10	1 "	"	20 "	"	"



**Ergebnis.** Die 5 mit der Waschflüssigkeit des Virusfettgemisches subdural injizierten Hunde gingen innerhalb 5 Tagen wie die Kontrollen an Tollwut zugrunde.

## **II. Fetteinwirkung auf das Immunisationsvermögen des Tollwutvirus.**

Nachdem die Attenuationswirkung der Fette auf das fixe Virus festgestellt worden war, ging ich zur Untersuchung der Fettwirkung auf das Immunisationsvermögen des fixen Virus, d. h. auf den antirabischen Impfstoff über.

Das fixe Virus wurde mit einem flüssigen Fette, am besten mit Olivenöl emulgiert.

**Versuch.** Mit Straßenvirus im voraus geimpfte Ratten wurden während 10—15 Tagen mit 2 ccm einer Emulsion aus Olivenöl und einer Suspension von 5 g fixem Virus in 100 ccm 1-proz. Phenol täglich 2mal wieder injiziert.

Zum Vergleich wurde der Versuch unter Anwendung einer Virus-suspension in 1-proz. Phenol (Impfstoff nach Fermi) als Immunisationsmaterial wiederholt (s. Tabelle p. 501).

**Ergebnis.** Aus diesen Versuchen ist zu ersehen, daß alle 14 mit Straßenvirus und nachher 10—15 Tage lang mit einer Emulsion von Olivenöl und Impfstoff geimpfte Ratten gleich den Kontrollen starben, während alle 11 mit demselben Impfstoff injizierte Tiere überlebten. Daraus ist zu schließen, daß Fette (Olivenöl) entweder durch direkte Attenuationswirkung auf das fixe Virus, oder durch direkte Beeinflussung des Organismus den Tollwutimpfstoff seines Immunisationsvermögens gänzlich berauben.

*Nachdruck verboten.*

## **Experimentelle Untersuchungen über die Aetiologie des Sommerfiebers.**

[Aus dem Institut für Hygiene der Königl. Universität Parma  
(Leiter: Prof. Dr. E. Bertarelli).]

Von  
**Dr. Aldo Tedeschi,** und **Dr. Melchiorre Napolitani,**  
Assistenten des Institutes. Regimentsarzt.

Mit 3 Figuren.

### **Einleitung.**

Vorliegende Arbeit, welche unsere im „Policlinico, sezione pratica, Agosto 1910, sowie im Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 57. Heft 3 erschienene, das gleiche Thema behandelnde vorläufige Mitteilung ergänzt, verfolgt den Zweck, die klinische, speziell aber die ätiologische Identität der uns als Sommerfieber bekannten Krankheit mit dem Doerrschen durch „Pappataci“ (Stechmücken) erzeugten sogenannten Dreitagsfieber nachzuweisen.

Bei Besprechung der verschiedenen Kapitel werden wir die bereits von zahlreichen Autoren eingehend beschriebene geschichtliche bzw. klinische und epidemiologische Seite der Erkrankung nur flüchtig be-

rühren und uns hierbei darauf beschränken, manchen noch strittigen Punkt zu erörtern. Ausführlicher wollen wir uns hingegen mit den die Auffindung des ätiologischen Erregers und seiner Diffusionswege bezweckenden experimentellen Forschungen befassen.

### Wesen der Krankheit.

Seit mehreren Jahren tritt von den ersten Junitagen an bis Ende August in vielen Provinzen Italiens, namentlich aber in den nördlichen Gegenden (Potal), eine stets mit Fieber einhergehende, wegen ihrer raschen Entstehung und Verbreitung Besorgnis erregende Krankheit von ausgesprochen epidemischem Charakter auf, die ganz besonders dort um sich greift, wo Menschen zusammenleben (Kasernen, Kerker, Institute usw.).

Die Krankheit, die einen stets günstigen Ausgang hat, ist durch einen ungefähr 60 Stunden anhaltenden Fieberanfall gekennzeichnet, der beim Kranken eine ca. 14 Tage andauernde, starke Ermattung hinterläßt.

### Benennungen.

Die in Rede stehende Krankheit wurde in Italien verschieden benannt, und zwar wurde dieselbe zunächst von den Militärärzten als „Sommerfieber“ bezeichnet, im Hinblick auf die Jahreszeit, in der sie auftritt, von anderen wieder als Infektionsfieber, klimatisches Fieber, ephemeres Fieber, gastrorheumatisches Fieber, Sommerinfluenza, Malariainfluenza, Male della secca (d. h. Krankheit bei niedrigem Wasserstande) usw.

### Geschichtliches.

Die ersten Beobachter, die sich mit dieser Krankheitsform befaßten und deren Ursache zu ergründen suchten, waren Militärärzte.

Schon 1888 hatte Oberstabsarzt Saggini im Sanitäts-Jahresbericht der Bologneser Garnison auf dieselbe hingewiesen.

1895 machten Burelli und Cevaschi und 1896 auch Sforza auf die jährlich in Bologna auftretende Sommerfieberepidemie aufmerksam, die nicht nur unter dem Militär, sondern überhaupt an Orten mit gemeinschaftlicher Lebensweise (Zuchthaus, Gefängnis zu S. Giovanni in Monte) herrschte. Aber auch über solche Orte hinaus hatte sich das Fieber verbreitet, wie dies aus den Angaben der oben erwähnten Autoren sowie aus einer Mitteilung Gambaras hervorgeht, der eine dieser unter der Bevölkerung der Stadt Parma ausgebrochenen Epidemien studiert hat.

Stabsarzt Sforza hatte auch vom hämatologischen Standpunkte aus genauere Studien über die Aetiologie der Krankheit unternommen und angeblich bei der mikroskopischen Untersuchung des von 6 Patienten stammenden Blutes einen rund gestalteten Parasiten bemerkt, den er zu den Amöben gezählt hatte, ein Befund, der aber von keiner anderen Seite bestätigt worden war. In den darauffolgenden Jahren kamen, stets im Sommer, verschiedene Epidemien dieses Fiebers in verschiedenen Städten bzw. Gegenden Italiens zur Beobachtung.

1902 erscheint eine bemerkenswerte Berichterstattung von Oberst Ferrero di Cavallerleone, dem gegenwärtigen Oberaufseher des Militär-Sanitätswesens, über eine der Besatzung des Castel Santangelo zu Rom ausgebrochene Fieberepidemie.

Eine einschlägige Arbeit wird 1907 von Mendes veröffentlicht. Derselbe hatte bereits 1904 in Rom bei der dortigen Grenadierbrigade angefangen, sich mit der Krankheit zu befassen und wichtige bakteriologische

Untersuchungen über die Aetiologie derselben angestellt, aus denen er die Ueberzeugung gewann, daß eine typhusähnliche Krankheit vorlag.

Meunella, der lange hindurch in Piacenza in Garnison gewesen, und daher Gelegenheit gehabt hat, die jahraus jahrein beim IV. Genieregiment sich einstellenden Fieberepidemien zu beobachten, ist zu ähnlichen Schlüssen gelangt wie Mendes.

Schließlich ergibt sich aus den in den letzten Jahren von uns nicht nur in den einzelnen Kasernen der Stadt Parma, sondern auch in den benachbarten Städten und Ortschaften angestellten diesbezüglichen Beobachtungen und Untersuchungen, daß das Sommerfieber, wenn es auch milder auftrat, doch denselben Verlauf genommen und dieselbe Verbreitung erlangt hat, wie sonst, wie dies auch aus der allerjüngsten Arbeit De Napolis über dieses in Bologna herrschende Fieber zu entnehmen ist.

### Klinische Merkmale.

Seit einem Jahrzehnt verfolgen wir in der hiesigen Garnison (Parma) den Gang der in Rede stehenden Erkrankung, und können nun mit aller Sicherheit behaupten, daß dieselbe eine Milderung erfahren hat, was auch von verschiedenen, von uns hierüber befragten Militärärzten anderweitiger Garnisonen bestätigt wird.

Die in den vergangenen Jahren aufgetretenen Sommerfieberepidemien waren für die einzelnen Regimenter ein wahres Unglück; die Zahl der Fälle, die Bedenklichkeit derselben, die Folgen der Krankheit hatten einen weit höheren Grad erreicht.

Die nervösen Erscheinungen (Kopfwahl, Algien, Delirium) beherrschten das Krankheitsbild; die Temperaturerhöhungen waren von schweren Depressionen begleitet, und die Zahl der in den Militärspitälern untergebrachten Kranken war auf das höchste gestiegen.

Es genügt, die Krankenverzeichnisse mancher Militärspitäler aus dem jüngst vergangenen Dezennium zu durchblättern, um sich von der Richtigkeit obiger Angaben zu überzeugen.

Es hat sich bei den letzten Epidemien ergeben, daß die Krankheit einen im allgemeinen milderen Verlauf genommen hat, so daß nur bei 10 Proz. der davon Befallenen Temperaturen über 40° C und in wenigen Fällen Subdelirium und sonstige schwere Erscheinungen zur Beobachtung gelangten.

Wir können Hunderte von diesbezüglichen Krankengeschichten angeben, aus denen fast immer nachstehendes Krankheitsbild zu entnehmen ist:

Bei bester Gesundheit wird das Individuum von einem vagen Gefühl des Unwohlseins befallen; es folgen hierauf Schmerzen in den unteren Extremitäten und an den Lenden; recht bald stellt sich auch das Fieber ein, welches rasch — in ungefähr 12 Stunden — einen Höhepunkt erreicht, worauf es in einer ziemlich allmählichen Kurve ohne irgendwelche Remission wieder herabsinkt, bis es schließlich in ca. 60 Stunden ganz aufhört.

Mitunter aber hat das Fieber keine Vorläufer; Kopfwahl und Schmerzen in den Gliedmaßen — die ständigen Begleiterscheinungen desselben — stellen sich erst später ein.

Wir haben Soldaten nach den gewohnten Exerzierübungen fieberkrank vom Pferde steigen gesehen, ohne daß sie irgendwelches prodromisches Zeichen verspürt hätten.

Bei solchen Kranken ist der Appetit im allgemeinen noch erhalten, bei manchen ist er herabgesetzt; die Zunge ist jedoch stets weiß belegt, es besteht Verstopfung und in der Ileocöcalgegend sind ganz vereinzelte kollernde Geräusche vernehmbar.

Nur in seltenen Fällen ist Anorexie vorhanden. Eine Lokalisation im Magen-Darmapparat muß hier klinisch ausgeschlossen werden, erstens mit Rücksicht darauf, daß die in den Isolierungslokalen des Regiments behandelten Kranken, die doch Eier, Milch, Bouillon in ausgiebigem Maße bekamen, häufig, ja mitunter selbst bei hohem Fieber, nach der gewöhnlichen Kost verlangten, und zweitens weil in den Hunderten von uns beobachteten Fällen wir niemals irgendwelche mit dem Genuß dieser Kost zusammenhängende Komplikation bemerkt haben. Daher haben wir dieses diätetische Regime auch getrost geduldet, wohl wissend, dasselbe werde in keiner Weise den weiteren Verlauf der Krankheit beeinflussen.

Mendes und De Napoli haben in den von ihnen beobachteten Fällen gleichfalls das gänzliche Fehlen jeglicher den Verdauungskanal betreffenden Störung festgestellt.

In manchen Fällen ist auch Rötung der Mandeln und des Schlundes beobachtet worden, aber weiter nichts; in manchem anderen wieder Nasenbluten. Der Atmungsapparat blieb dabei unbeschädigt. Niemals haben wir Milzvergrößerung wahrgenommen.

Recht bemerkenswert sind die bei dieser Krankheit stets vorhandenen nervösen Erscheinungen; das Kopfweh läßt meistens mit dem Sinken des Fiebers nach, während die Schmerzen in den unteren Gliedmaßen und der Lendengegend häufig selbst in der Rekonvaleszenz tagelang anhalten, wenn auch in minder starkem Maße, als bei den von uns beobachteten früheren Epidemien.

So ist einem von uns (Napolitani), der 1901 hier in Parma dem Kavallerieregiment zugeteilt war, noch erinnerlich, daß während der Sommermonate der an der Sukkursaale des hiesigen Militärspitals diensthabende Militärarzt häufig des Nachts in die benachbarten Kasernen gerufen wurde, um daselbst plötzlich an Sommerfieber erkrankten Soldaten beizustehen, die neben einer bedeutenden Temperaturerhöhung so auffallende nervöse Erscheinungen darboten, daß deren sofortige Einlieferung ins Militärspital als unerläßlich erkannt wurde.

Verschweigen wollen wir jedoch nicht, daß auch bei dieser letzten Epidemie die erwähnten Erscheinungen in einem Falle einen solchen Bedenklichkeitsgrad erreicht hatten, daß sie zu der irrthümlichen Ansicht verleiteten, es liege Meningitis cerebrospinalis vor.

Was die Reflexe anbelangt, so hat die diesbezügliche Untersuchung keinerlei Anomalität ergeben.

Der systematisch untersuchte Harn gestattete, im Höhepunkt des Fiebers das Vorhandensein einer großen Menge von Urobilin festzustellen; dieselbe nahm jedoch in der Rekonvaleszenz merklich ab, niemals Eiweiß noch sonst irgendwelche pathologische Befunde.

Es hängt dies wohl mit der gelegentlich der Blutuntersuchung festgestellten Hämolyse zusammen.

Die Krankheit rezidiert leicht im Laufe der Epidemie. Nach manchen sollen die Kranken sich während des ganzen, auf die überstandene Infektion folgenden Jahres der Immunität erfreuen. Unsererseits sind wir nicht in der Lage gewesen, diese Angabe für das Jahr 1909 zu kontrollieren, und zwar wegen des in diesem Jahre erfolgten Garnisonwechsels; ebenso für 1910, wo die ältere Klasse behufs Uebernahme des Polizeidienstes anderwärts die Stadt verlassen hatte.

#### Differentialdiagnose.

Das Sommerfieber kann mit der Croupinfektion nicht verwechselt werden, und zwar weil es in einer anderen Zeit auftritt, ferner wegen des Fehlens von Koryza sowie jeglicher Veränderung der Luftwege, wegen der viel kürzeren Dauer des Fiebers und schließlich wegen des gänzlichen Fehlens der so häufig nach Croup sich einstellenden Erkrankungen (Neuralgien, Otitis, Bronchitis, Pneumonie).

Sie differenziert sich von einem Malariainfektionsanfall:

- a) Durch das Nichtvorhandensein des spezifischen Parasiten im Blute;
- b) durch die längere Dauer des Fiebers;
- c) durch das Fehlen einer Milzanschwellung;
- d) durch das starke, nach überstandenem Fieber noch lange anhaltende Unwohlsein;
- e) durch das Fehlen einer eigentlichen Attaque, wie sie bei Malaria vorkommt;
- f) durch das Nichtwiedereintreten des Fieberanfalls nach einer gewissen Zeit, wie dies bei Malaria der Fall ist;
- g) durch das Fehlen einer sekundären Anämie.

Mit Typhus bzw. paratyphöser Infektion kann das Sommerfieber kaum verwechselt werden, zunächst im Hinblick auf die bakteriologische Untersuchung, sodann wegen der negativ ausfallenden Serumdiagnose, wegen der Dauer und der Kurve des Fiebers (bei Typhus abortivus und Similtypus dauert die Pyrexie stets länger als beim Sommerfieber), wegen Fehlens einer — bei Typhusinfektionen immer oder fast immer vorhandenen — Milzschwellung, sowie schließlich des Fehlens der bei Typhus so häufig zu beobachtenden Rezidive. Und ebenso kaum möglich ist eine Verwechselung mit einem rheumatischen Infektionsfieber zunächst wegen des starken Umsichgreifens der Krankheit, wegen des beständigen Fehlens einer Mandelentzündung, die gar zu häufig dem rheumatischen Fieber vorangeht; wegen des Fehlens von — bei diesem letzteren ebenso häufig sich einstellenden — Gelenk-, Muskel-, Nerven-, Herzaaffektionen, wegen der schlimmeren Rezidive beim rheumatischen Fieber. Aber auch in anbetracht des Verlaufs der Fieberkurve und des in jedem einzelnen Falle sowohl kulturell wie bakteriologisch negativen Blutbefundes sowie der hierbei eintretenden spezifischen Agglutinierung erscheint die Möglichkeit einer Verwechselung mit dem Mittelmeerfieber so gut wie ausgeschlossen. Schließlich haben verschiedene Forscher eine große Aehnlichkeit ge-

funden zwischen unserem Sommerfieber und dem — wie die Untersuchungen Grahams zu Beyruth dargetan haben — durch *Culex fatigans* verbreiteten Denguefieber.

Und tatsächlich erscheint denn auch diese Aehnlichkeit im ersten Augenblick als eine auffällige, nur muß hierzu bemerkt werden, daß das Denguefieber in unseren Ländern äußerst selten auftritt und durch heftige Schmerzen sowie durch ein polymorphes Exanthem charakterisiert ist, welches letztere beim Sommerfieber vermißt wird; schließlich hat dieses einen anderen, im allgemeinen aus zwei durch ein dazwischenliegendes Remissionsstadium geschiedenen Verlauf.

### **Allgemeine Epidemiologie und Analogie mit den fremdländischen Formen.**

Das Sommerfieber ist in Italien weit verbreiteter, als man zu glauben geneigt ist.

Wie aus den bereits oben zitierten Publikationen der italienischen Militärärzte hervorgeht, tritt dasselbe unter dem in den großen Städten des Po-Tales in Garnison liegenden Militär endemisch auf; angetroffen hat man es ferner im Flußgebiet des Tiber, in Rom, in Sizilien, Calabrien, so daß man wohl sagen kann, daß sämtliche Gegenden Italiens mehr oder minder schwer davon betroffen wurden.

Auf Grund genauer in dieser Richtung von uns angestellter Nachforschungen haben wir uns überzeugen können, daß die Krankheit nicht nur unter der Bevölkerung der großen Städte, sondern auch unter jener der an den Ufern der rechtsseitigen Po-Zuflüsse (Arda, Taro, Parma, Baganza, Enza u. a.) gelegenen Ortschaften um sich greift.

Sie wurde zu der großen Gruppe jener Fieberkrankheiten gezählt, die während des Sommers in den heißen Ländern endemisch zu herrschen pflegen und deren ätiologischer Erreger noch unbekannt ist.

Man hat sie identifiziert mit dem Denguefieber, mit dem kontinuierlichen Fieber Indiens, mit dem Fieber von Shanghai, mit dem Docksfieber der Ankömmlinge oder der Nichtakklimatisierten von Bombay, mit jenem von Chitral, mit den klimatischen Fiebern Algeriens, mit den gewöhnlichen kontinuierlichen Fiebern von Massaua und überhaupt mit allen jenen Fiebern, die in ähnlicher Form im Mittelmeerbecken (Albanien, Griechenland, Kleinasien, Syrien, Aegypten, Sudan usw.) sowie im äußersten Osten bekannt sind und die im allgemeinen nach der Gegend benannt werden, wo sie eben vorkommen.

Wenn wir nun unsererseits im Hinblick auf die Ergebnisse unserer Untersuchungen die Identität unseres Sommerfiebers mit dem in Bosnien und der Herzegowina durch „Pappataci“ erzeugten (Doerr, Franz und Taussig), ferner mit dem klimatischen von Kreta (Rossini), mit dem gleichfalls durch „Pappataci“ erzeugten von Malta und Kreta (Birt), mit der letzten in Messina und an der kalabrischen Küste ausgebrochenen Dreitagsfieberepidemie sowohl wegen der vollkommenen Identität der klinischen Form, als auch mit Rücksicht auf den Krankheitserreger für unbestreitbar halten, so können wir es doch weder mit dem Fieber von Verona, das von Loschi selbst als ein solches von typhöser Form bezeichnet worden ist, noch mit vielen der oben erwähnten Formen als identisch ansprechen.

So ist z. B., wie uns Dr. Quattrocchi, Oberarzt der Königl. Marine, brieflich berichtet hat, das Fieber von Shanghai weiter nichts als ein Paratyphus, dessen Temperaturkurve 21 Tage dauert, ebenso das Fieber der Docks, der Nichtakklimatisierten von Bombay, welches nach einer brieflichen Mitteilung Polverinis, der das Malariafieber an Ort

und Stelle studiert hat, von unbestimmter Natur ist, mit Lokalisationen im Darm einhergeht und länger andauert.

### **Epidemiologisches über die Besatzung der Stadt Parma.**

Die Besatzung von Parma ist eine sehr ansehnliche; sie besteht aus:

Zwei Infanterieregimentern,  
einem Kavallerieregiment,  
einer Brigade des 21. Feldartillerieregiments,  
der Infanterieübungsschule,  
dem Militärspitale (Sukkursale),  
dem Depot des 2. Grenadierregiments,  
den Königl. Carabinieri (Gendarmen) und noch anderen Mannschaften für verschiedene Dienstleistungen.

Wie aus der weiter unten angegebenen Topographie von Parma zu ersehen ist, sind die Mannschaften in verschiedenen, in den einzelnen Stadtteilen gelegenen Kasernen untergebracht.

Mit Ausnahme der Infanterieübungsschule, einem stattlichen Gebäude ziemlich neuer Konstruktion, mancher zur Kaserne Aless. Farnese — der ehemaligen Zitadelle — gehörenden Pavillon, und der kleinen Kaserne Vittorio Bottego, sind diese Bauten ehemalige Klöster bzw. öffentliche Gebäude, denen infolge ihrer Umgestaltung bzw. Herrichtung zur Behausung der Mannschaften große Uebelstände anhaften.

Wir beschränken uns auf die epidemiologischen Erhebungen von 1910, da dieselben von denen der vorhergehenden Jahre nur wenig abweichen.

Die vom Sommerfieber besonders heimgesuchten Kasernen sind nun folgende:

Principe Amedeo,  
Smeraldo Smeraldi,  
Riccio da Parma  
sowie ein vom Depot des 2. Grenadierregiments eingenommener Pavillon der Kaserne A. Farnese.

Einen niedrigeren Prozentsatz boten die zwei vom 62. Infanterieregiment eingenommenen Nebengebäude der Kaserne A. Farnese, das Militärspital und die Infanterieübungsschule.

Verschont blieben die Kasernen:

Vittorio Bottego,  
Emanuele Filiberto,  
Ugo Sanvitale,  
Santo Spirito,  
ein von der Artillerie eingenommenes Nebengebäude der Kaserne A. Farnese.

Es entstand nun die Frage, ob die Infektion etwa in der Lage dieser Kasernen ihren Grund hätte.

Vor allem erschien hierbei ein Einfluß des im Sommer meist ausgetrockneten, nur hie und da noch etwas stehendes Wasser enthaltenden Parmaflusses so gut wie ausgeschlossen. Denn während die Infektion die am rechten Ufer gelegene Kaserne Principe Amedeo stark mitgenommen hatte, war die fast genau gegenüber am linken Ufer liegende Kaserne Vittorio Bottego davon durchaus verschont geblieben.

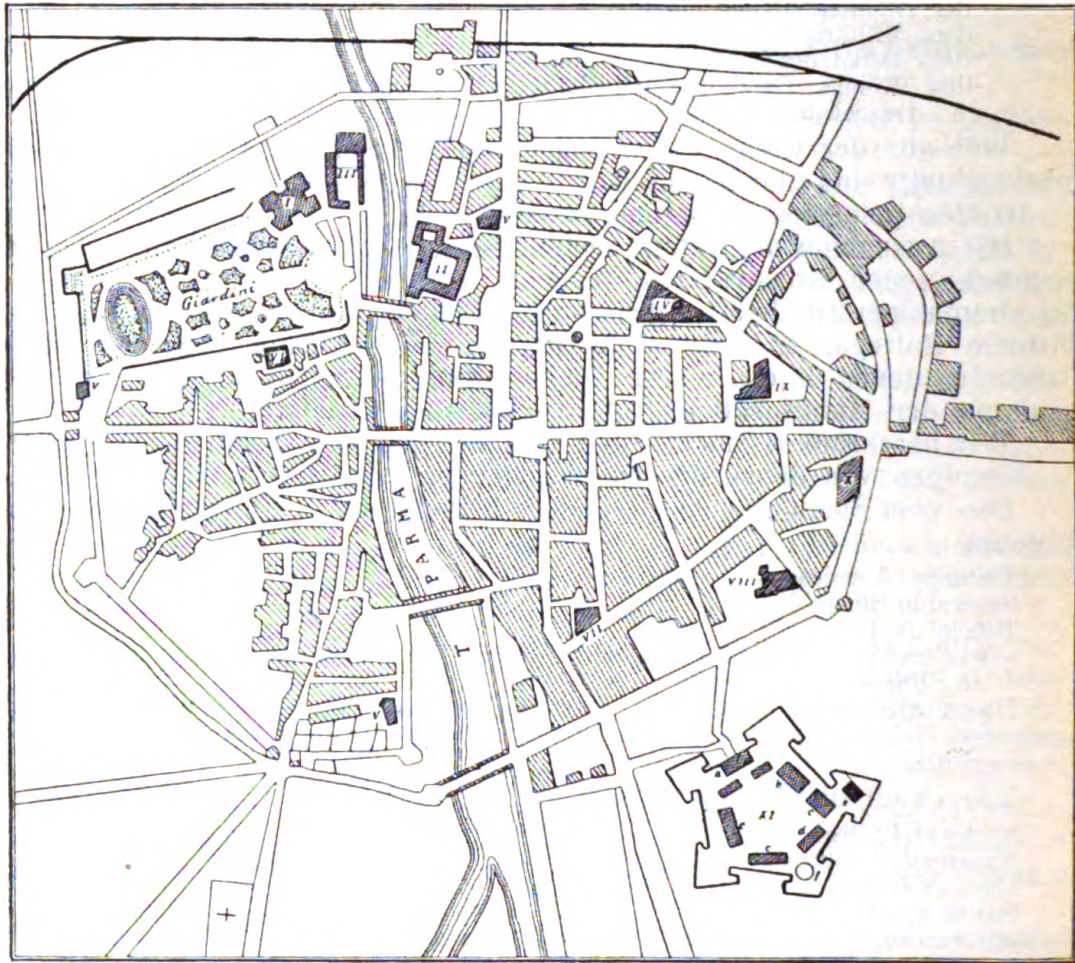
Ebensowenig ließ sich die Ursache erblicken in den zum Bau des Kai längs der Westseite der Kaserne Principe Amedeo vorgenommenen Ausgrabungen, bzw. der Wegschaffung des daselbst befindlichen Schuttmaterials, denn diese Kaserne ist seit mehreren Jahren der Sitz der Infektion geworden, also bevor man besagte Arbeiten in Angriff genommen hatte.

Und auch nicht die Lage war dafür verantwortlich zu machen, denn während in der nahe der verschont gebliebenen Kaserne Vittorio Bottego



liegenden Infanterie-Uebungsschule die Infektion ausgebrochen war, war dagegen die auch von Mannschaften der Schule eingenommene und jenseits des Flusses, mitten in einem Gewirr von engen Straßen und ungesunden, von einer die Hygiene wenig beachtenden Bevölkerung bewohnten Häusern gelegene Kaserne S. Spirito nicht betroffen worden.

Plan der Stadt Parma.



Militärgebäude.

I	Infanterie-Uebungsschule	IX	Militärspital
II	Kaserne P. Amadeo	X	Kaserne Em. Filiberto
III	„ V. Battego	XI	„ A. Farnese
IV	„ Smeraldo Smeraldi	a	Platzkommando
V	„ S. Spirito	b	Artillerie
VI	„ Riccio da Parma	c	Infanterie
VII	„ Ugo Sanvitale	d	Grenadiere
VIII	„ Königl. Carbiniers	e	Pulverturm

Schließlich konnten wir Lagenverhältnisse auch nicht zur Erklärung heranziehen, denn in der Kaserne A. Farnese hatten wir ein Nebengebäude — Grenadierdepot — mit einer ziemlich hohen Prozentzahl von Betroffenen, ein zweites — Artilleriebrigade — welches davon frei war und noch andere Nebengebäude — 62. Infanterieregiment — mit einer sehr geringen Prozentzahl.

Durch genaue Besichtigung der verschiedenen Kasernen auf ihre Bauart, auf die Verteilung und Instandhaltung der einzelnen Lokale gelangten wir zu der Ueberzeugung, daß auch hier nicht die Ursache der Infektion zu suchen war.

Betroffen war z. B. die Kaserne Principe Amedeo, das größte Gebäude von verhältnismäßig neuer Konstruktion, das doch gut gehaltene und gehörig ventilierte Schlafzimmer hat; die Infanterie-Uebungsschule, die in bezug auf Reinlichkeit, Geräumigkeit und Ordnung der Lokale wohl nichts zu wünschen übrig läßt; und ein ganz neuerbauter Pavillon der Kaserne A. Farnese (62. Infanterieregiment); verschont blieben hingegen die Kasernen S. Spirito, Emmanuele Filiberto, Ugo Sanvitale, die sämtlich ehemalige, umgebaute Klöster sind, und daher wohl kaum ideale Wohnräume fürs Militär darbieten können.

Ausschließen mußten wir endlich als Ursache der Infektion ein dichtes Beisammensein in den Schlafzimmern. Im jüngst vergangenen Sommer war nämlich ein Teil der Truppen, speziell das Kavallerieregiment „Lancieri di Montebello“ mit dem Polizeidienst außerhalb der Stadt betraut worden, so daß nur ein Drittel der Individuen, die in diesen Zimmern zu schlafen pflegten, zurückgeblieben war. Dessenungeachtet wiesen diese Zimmer einen Prozentsatz an Erkrankten auf, der nur wenig von demjenigen der vorhergegangenen Jahre abwich.

Nachstehende Tabelle gibt auf Grund der uns von Militärärzten (Herrn Regimentsarzt Ugolini, den Herren Unterärzten Visconti und Grifi, denen wir hier verbindlichst danken) freundlichst zur Verfügung gestellten Statistiken die Zahl der bei den verschiedenen Regimentern von der Krankheit Betroffenen.

Tabelle A.

Statistische Uebersicht der während der Epidemie von 1910 bei den einzelnen Korps bzw. Abteilungen der Garnison von Parma an Sommerfieber Erkrankten.

Korps bzw. Abteilung	Zahl der Erkrankten	Prozentsatz der Erkrankten	Ausgefallene Arbeitstage	Bemerkungen
61. Infanterieregiment	199	49,6	2985	Vorliegende Zusammenstellung umfaßt nur die im Spital bzw. in Krankensälen oder Isolierungslokalen untergebrachten Kranken. Nicht einbegriffen sind hier die leichteren Formen, die sich häufig der Beobachtung entziehen. Die ausgefallenen Arbeitstage sind auf 15 berechnet für jeden einzelnen Kranken.
62. Infanterieregiment	21	3	315	
Infanterieübungsschule	69	37,3	1035	
Grenadierdepot	35	55,5	375	
21. Artillerieregiment				
Kavallerieregiment				
Lancieri di Montebello im Jahre 1909	234	68,4	3510	
Kavallerieregiment				
Lancieri di Montebello im Jahre 1910	172	57	2580	
Militärspital	10	25	150	

### **Zusammenhang des Epidemieverlaufs mit den atmosphärischen Verhältnissen und der Gegenwart der „Pappataci“ (Schnaken) in den Kasernenzimmern.**

Im Jahre 1909 hatten wir genaue meteorologische Beobachtungen unternommen in der Absicht, einen zwischen diesen letzteren, dem Verlauf der Epidemie und der Gegenwart der Stechmücken etwa bestehenden Zusammenhang herauszufinden. Solche Beobachtungen wurden in den

**Uebersichtstabelle B.**  
**Numerisches Verzeichnis der in der Kaserne Principe Amedeo zu Parma täglich an Sommerfieber Erkrankten, nebst meteorologischen und epidemiologischen Angaben.**  
**Jahr 1909.**

Datum	Anzahl der Fälle	Temperatur			Meteorologische Angaben	Epidemiologische Angaben
		maximale	minimale	mittlere		
16. Juni	2	22,6	15,4	18,15	Starker Regen, Gewitter, Hagel	—
17. "	1	25,2	14,6	19,20	Himmel heiter	—
18. "	—	26,1	17,9	21,10	" "	—
19. "	—	28,5	16,7	21,50	" "	—
20. "	—	29,3	17,3	22,45	" "	—
21. "	—	27,3	19,1	23,65	" "	—
22. "	1	27,8	17,1	22,30	" "	—
23. "	1	23,7	19,0	20,87	Platzregen, sehr starker Wind	—
24. "	—	24,6	18,2	20,85	Himmel heiter	—
25. "	1	25,2	15,7	20,50	" "	—
26. "	2	24,5	15,2	18,97	" "	—
27. "	—	25,6	12,8	18,50	" "	—
28. "	4	25,9	14,7	20,02	" "	—
29. "	3	24,2	16,4	20,15	starker Wind	—
30. "	4	25,5	15,0	20,30	starker Nordwestwind	—
1. Juli	6	27,1	24,9	20,6	hell	—
2. "	2	25,0	16,0	19,8	" "	—
3. "	1	23,4	14,7	20,1	" "	—
4. "	—	26,7	17,3	21,5	" "	—
5. "	4	27,0	13,3	22,5	" "	—
6. "	5	26,7	17,8	22,3	" "	—
7. "	2	24,3	17,7	20,2	feiner Regen, sehr starker Wind	1 Rezidiv
8. "	5	24,5	15,9	20,1	starker Wind	2 Rezidive
9. "	10	25,6	13,8	20,5	hell	2 Feldwebel in der Krankenstube
10. "	15	25,2	16,3	21,2	" "	2 Feldwebel
11. "	5	23,1	15,2	18,9	" "	1 Rezidiv
12. "	4	24,7	12,7	18,4	" "	—
13. "	5	23,6	15,0	19,25	starker Wind	—
14. "	8	26,7	18,8	19,87	kurzdauernder Regen am Nachmittag	—
15. "	5	27,1	15,9	21,57	hell	—
16. "	4	27,4	17,0	20,72		—



17. Juli	5	29,10	19,5	23,5	hell	1 Rezidiv, Posten im Isolierungszimmer
18. "	6	31,1	18,8	25,6	"	3 Rezidive
19. "	5	32,3	19,0	26,25	"	2 Rezidive, 1 aus einer immunen Schwadron; Posten im Pferdespital
20. "	3	29,2	21,8	24,65	"	—
21. "	3	28,7	17,9	24,27	"	2 Rezidive und 1 Posten im Pferdespital
22. "	5	29,6	20,9	25,27	"	—
23. "	6	31,7	22,0	26,42	"	—
24. "	3	30,8	20,7	25,4	"	2 Rezidive
25. "	8	33,3	21,5	27,62	"	1 Rezidiv, 1 in der Krankenstube
26. "	7	34,4	21,0	27,75	"	1 Rezidiv
27. "	5	34,3	22,1	27,32	"	2 Rezidive
28. "	8	32,1	21,5	26,2	"	1 Rezidiv
29. "	5	31,4	20,4	25,87	"	2 Rezidive
30. "	5	31,3	21,0	25,57	"	1 Rezidiv
31. " Aug.	9	32,7	20,2	26,8	"	1 Rezidiv
2. "	2	32,7	21,9	27,87	"	1 aus einer immunen gebliebenen Schwadron, Posten in der Kaserne P. Amedeo
3. "	6	32,6	32,2	27,22	"	1 Rezidiv
4. "	6	29,5	20,2	25,0	Gewitter mit Blitz und Regen	3 Rezidive
5. "	4	23,5	16,0	20,42	Donner, Blitz und Regen	1 Rezidiv
6. "	2	20,7	15,7	18,27	Regen	2 Rezidive
7. "	8	24,7	19,3	21,61	hell	2 Rezidive
8. "	4	29,1	18,8	24,55	"	—
9. "	—	32,0	20,8	26,17	"	—
10. "	1	34,3	21,4	27,02	"	—
11. "	1	29,6	22,1	24,45	Regen, Gewitter, starker Wind	—
12. "	1	27,5	19,0	22,17	hell	—
13. "	3	32,0	19,3	26,0	"	1 Rezidiv in der Krankenstube
14. "	2	32,1	20,3	26,35	"	—
15. "	2	33,2	21,7	27,35	"	3 Rezidive, 1 zum zweiten Male
16. "	4	34,4	22,3	29,15	"	—
17. "	—	32,6	22,3	26,55	"	1 Rezidiv
18. "	1	27,5	22,5	24,17	starker Wind	—
19. "	1	31,6	19,8	25,65	hell	—
20. "	1	30,5	20,4	26,95	"	—
21. "	—	29,2	19,9	24,35	"	—
22. "	1	30,0	19,0	24,4	Regen, Gewitter	1 Rezidiv
22. "	2	21,9	19,1	20,62	"	—

Anmerkung: Als immunen bezeichnet sind hier die Schwadronen aus den Kasernen V. Bottege und E. Filiberto.

**Uebersichtstabelle C.**  
Numerisches Verzeichnis der in der Kaserne Prinzipe Amedeo zu Parma täglich an Sommerfieber Erkrankten nebst meteorologischen und epidemiologischen Angaben.  
Jahr 1910.

Datum	Anzahl der Fälle	Temperatur		Meteorologische Angaben	Epidemiologische Angaben
		maximale	minimale		
21. Juni	1	24,0	17,2	Himmel heiter	—
22. "	—	26,7	16,3	"	—
23. "	1	27,1	16,3	"	—
24. "	—	26,7	16,9	"	—
25. "	—	28,4	18,6	"	—
26. "	1	24,5	20,7	"	—
27. "	2	27,5	15,7	"	—
28. "	2	28,3	17,0	"	—
29. "	5	26,9	18,0	"	—
30. "	2	26,0	19,1	sehr starker Wind	—
1. Juli	3	27,0	18,3	hell	—
2. "	4	27,0	16,6	"	—
3. "	6	24,8	17,7	"	—
4. "	7	20,4	14,8	Regen, Blitze, Donner	—
5. "	2	25,4	13,1	hell	—
6. "	5	24,7	15,6	"	—
7. "	4	24,6	16,3	"	—
8. "	1	24,6	15,0	"	—
9. "	2	27,7	14,9	"	—
10. "	3	27,1	16,8	"	—
11. "	8	27,4	16,4	"	1 Krankenwärter
					1 aus einer immun gebliebenen Schwadron, derselbe hatte in der Kaserne P. Amedeo geschlafen
					1 Rezidiv
12. "	7	25,5	17,3	"	—
13. "	—	27,7	17,8	"	1 Rezidiv
14. "	4	30,4	21,1	"	3 Rezidive
15. "	5	30,5	19,3	"	1 Rezidiv
16. "	4	28,7	19,6	"	3 Rezidive, darunter 1 Krankenwärter
17. "	4	31,1	19,0	Gewitterwolken, Blitze, Donner	—
18. "	5	31,7	19,7	starker Wind	3 Rezidive
19. "	8	29,8	22,8	"	—

20. Juli	8	29,6	20,8	24,5	hell	1 Rezidiv
21. "	5	31,3	20,6	25,6	"	3 Rezidive, darunter 1 aus einer immun gebliebenen Schwadron
22. "	2	32,3	20,4	25,5	sehr starker Wind, Blitze, Donner	—
23. "	3	30,8	21,2	24,4	hell	—
24. "	10	28,2	15,3	21,7	"	2 Rezidive
25. "	7	27,6	21,0	24,2	"	2 Rezidive, darunter 1 Krankenwärter
26. "	4	26,6	17,0	21,3	starker Wind	1 Rezidiv
27. "	6	25,0	14,0	19,3	Regen	2 Rezidive
28. "	6	25,9	15,5	21,2	hell	1 Rezidiv
29. "	2	29,5	17,1	23,1	"	—
30. "	1	30,5	18,6	24,2	"	—
31. "	2	32,0	19,3	25,2	"	—
1. Aug.	2	29,7	20,8	29,1	"	1 im Pferdespital wachhabender Mann dgl.
2. "	1	31,3	19,5	25,1	Regen am Nachmittag	—
3. "	1	26,7	20,3	23,4	hell	—
4. "	1	27,6	18,5	22,9	"	—
5. "	3	25,7	19,6	21,7	starker Wind, Gewitter	—
6. "	2	26,2	15,2	22,9	hell	—
7. "	1	24,0	16,0	19,3	"	—
8. "	3	26,8	15,3	22,0	"	—
9. "	1	22,3	16,9	19,9	Gewitter, starker Wind	—
10. "	—	23,3	16,4	19,1	hell	—
11. "	—	24,2	16,0	19,4	"	—
12. "	2	25,6	16,3	20,2	"	—
13. "	—	18,4	16,8	22,4	"	—
14. "	—	31,3	17,8	23,8	"	—
15. "	—	27,3	19,0	22,9	"	—
16. "	—	28,7	29,7	23,5	"	—
17. "	—	28,4	19,3	23,7	"	—
18. "	—	30,3	19,7	24,6	"	—
19. "	1	32,1	21,7	25,7	"	seit 4 Tagen neu angekommen
20. "	—	31,5	21,1	25,4	"	—
21. "	—	32,8	21,7	26,0	"	—
22. "	—	30,7	20,7	25,5	"	—
23. "	2	25,8	26,0	22,8	starker Nordwind	am 16. Aug. aus Ferrara angekommen

Anm.: Als immun bezeichnet sind hier die Schwadronen aus den Kasernen V. Bottego und E. Filiberto.



darauffolgenden Jahren mit ganz gleichen Resultaten wieder aufgenommen.

Aus den Uebersichtstabellen B und C, die richtige meteorologische bzw. Temperaturangaben enthalten — dieselben wurden vom astronomischen Observatorium der K. Universität Parma nachgeprüft — geht deutlich hervor, daß nach heftigen Winden resp. Gewittern mit starker Temperaturerniedrigung die Zahl der Erkrankten erst 4—5 Tage nach der atmosphärischen Störung abnahm, eine Erscheinung, die erst bei Besprechung der Inkubation ihre Erklärung finden wird.

Wir hatten zunächst im Gegensatz zur Angabe Mennellas — damals war uns die Arbeit von Doerr, Franz und Taussig noch unbekannt — während der ganzen Dauer der Epidemie, d. i. von Juni bis Anfang September die Gegenwart von sehr zahlreichen Mücken in den Schlafzimmern bemerkt. Bei erniedrigter Temperatur oder auch bei starkem Winde verschwanden die Insekten nahezu gänzlich, indem sie sich in die Wandrisse, in die Fugen der Plafondfalten, hinter die vom Militär gebrauchten, mit einem Kleiderrechen versehene Konsole, in die dunkelsten Schlupfwinkel des Schlafzimmers verkrochen, um nach wieder eingetretener Wärme und Ruhe von neuem hervorzukriechen. Wir hatten voriges Jahr Gelegenheit, diese Wahrnehmung zu bestätigen, als wir die Biologie dieses Insektes studieren mußten und zu den weiter unten zu erwähnenden Versuchen viele Hunderte von Exemplaren desselben benötigten.

### Biologie des *Phlebotomus pappatasi*.

Diese Mückenart ist durch Doerr, Franz und Taussig zu jener Gruppe von Zweiflüglern gezählt worden, welche die Fähigkeit besitzen, Krankheiten zu übertragen.

In der gelehrten Abhandlung Grassis („Ricerche sui flebotomi“) finden sich vollständige Angaben über die Anatomie dieses Insektes.

Um aber an dieser Stelle des großen Entomologen Camillo Rondani aus Parma zu gedenken, der für diese Mücke im Hinblick auf den „lanzettförmigen Saugrüssel und die böse Gewohnheit, unseren Adern Blut zu entziehen“, die Benennung „*Phlebotomus*“ eingeführt hat, wollen wir hier die Einleitung zu seiner 1840 in Parma herausgegebenen, von niemand sonst zu Rate gezogenen Abhandlung vollständig und wörtlich anführen. Dieselbe lautet:

„Es ist in den Wohnhäusern der Lombardei, speziell in den Schlafzimmern, ein kleines Insekt anzutreffen, welches ähnlich wie die Mücken seine Nahrung aus dem menschlichen Blute zieht. Am hellen Tage hält sich dasselbe verborgen hoch oben an den Wänden, an den Plafondbalken und Gesimsen, und verläßt diese Schlupfwinkel nur in der Abenddämmerung, oder zu der Stunde, wo behufs Milderung der zu starken Helle der Wohnräume die Fensterladen halb verschlossen gehalten werden.“

Man sieht da die Mücken in kurzen, sprungähnlichen Flugbewegungen allmählich herabsteigen, um ihrer Beute nachzuspüren, und, in der Nähe derselben angelangt, dieselbe zu umfliegen, um die passende Stelle zur Aussaugung des Blutes aufzufinden und in diese sodann einen langen, komplizierten Saugrüssel hineinzubohren.“

Es ist bekannt, daß nur das weibliche Insekt Blut saugt. Dasselbe unterscheidet sich vom männlichen durch das Fehlen der kopulatorischen Anhängsel und den rötlichen, plumpen Leib, namentlich wenn es Blut gesogen hat. Grassi gibt an, daß die Larven sich an dunklen feuchten Orten mitten unter allerhand Gebröckel aufhalten, mit besonderer Vorliebe in Kellern und Kloaken, in diesen letzteren aber ganz besonders an jenen Stellen, die von der Jauche nicht angespritzt werden können.

Die Puppen sind an den nämlichen Orten anzutreffen; sie sitzen verborgen in den Einbuchtungen der Steine, der Ziegel und des Gemäuers. Das erwachsene Insekt hält sich vorzugsweise in Wohnzimmern auf.

Wir wollen uns hier auf dieses Thema nicht weiter einlassen, da wir uns ohnedies in einer späteren Arbeit über die Prophylaxe des Sommerfiebers damit befassen werden. Vorläufig wollen wir nur betonen, daß wir bedeutende Mengen von erwachsenen Insekten nicht nur in den Pferdeställen und überhaupt in ebenerdigen Lokalen, sondern auch in den Schlafzimmern angetroffen haben, ja sogar in solchen, die, im letzten Stockwerke gelegen, bedeutend weit vom Erdboden abstanden.

### Experimentelle Untersuchungen.

Durch den Umstand besorgt gemacht, daß die in Bosnien und der Herzegowina befindlichen Truppen in den Sommermonaten von einer besonderen epidemisch auftretenden, fieberhaften Krankheitsform heimgesucht waren — in der Militärsprache „Hundskrankheit“ benannt — hatte das österreichische Kriegsministerium eine aus drei Mitgliedern (Doerr, Franz und Taussig) bestehende Kommission ernannt und damit beauftragt, genaue diesbezügliche Untersuchungen anzustellen. Dieselben ergaben, daß man es mit einer durch ein filtrierbares Virus hervorgerufenen, vermittelt der Stiche von *Phlebotomus papatasi* übertragbaren Fieberkrankheit zu tun hatte.

Als der von der Kommission erstattete Bericht bekannt gemacht wurde, sprach Memmo auf Grund der darin vorkommenden klinischen Angaben die Vermutung aus, es könne das bei unserem Militär vorkommende Sommerfieber wohl auch identisch sein mit dem von den genannten Autoren beschriebenen.

Es wurde daraufhin beschlossen, die Aetiologie dieses Fiebers zu studieren. Um aber hierbei planmäßig vorzugehen, wandten wir uns an Herrn Prof. Bertarelli, der sich auch bereitwilligst geneigt erklärte, uns an die Hand zu gehen, um so mehr, als auch ihm beim Abfassen einer den Bericht der österreichischen Kommissionsmitglieder betreffenden Rezension für die „Rivista d'Igiene e Sanità Pubblica“ die Identität des bosnisch-herzegowinischen Fiebers mit dem italienischen Sommerfieber als wahrscheinlich erschienen war. Grassi, Blanchard und noch andere hatten das Gleiche geahnt, ohne jedoch über das Hypothetische hinauszugehen, denn — wir betonen es gern — niemand hatte vor uns das experimentelle Gebiet je betreten.

Wir nahmen uns vor, das Fieber auf dieselbe Art und Weise zu reproduzieren, wie die österreichische Kommission es getan, und zwar durch Verwertung der von uns bereits im vorhergehenden Jahre (1910) über derartige Epidemien gemachten Erfahrungen. Zu diesem Behufe wurde das Nötige vorbereitet, um in der bevorstehenden epidemischen Saison von 1910 möglichst erfolgreich ans Werk gehen zu können.

Es war zu erwarten, daß ungefähr Mitte Juni das gewöhnliche Fieber in der Kavalleriekaserne Principe Amedeo auftreten werde; auch wußte man von dem gleichzeitigen Vorhandensein von Stechmücken in den Schlafzimmern, daher beschlossen wir, die Versuche folgendermaßen durchzuführen:

#### I. Gruppe.

Tierversuche { Transmission durch Einspritzung von Blutserum von  
an Sommerfieber Erkrankten.

## II. Gruppe.

- Versuche am Menschen { a) Direkte Transmission der Krankheit durch Blutserum von an Sommerfieber Erkrankten,  
b) Transmission vermittelt Stiche infizierter Mücken.

Als sich die ersten Fälle einstellten, sorgten wir für eine gewisse Menge Blutserum, um sofort Tierversuche damit anzustellen, und später, in der Ueberzeugung von der Unschädlichkeit desselben, zu Versuchen am Menschen überzugehen. Sobald nun in der Kaserne Principe Amedeo die Epidemie aufzutreten begann und wir klinisch die Gewißheit erlangten, daß die vorliegende Krankheitsform auch tatsächlich das Sommerfieber war, verschafften wir uns das zu unseren Versuchen erforderliche Serum.

Bezüglich der Wahl des einer Blutentziehung zu unterwerfenden Patienten waren wir darauf bedacht, einen solchen herauszufinden,

- a) der kräftig gebaut,
- b) seit 1—2 Tagen fiebernd gewesen war,
- c) bei dem die Fieberkurve ihren Höhepunkt erreicht hatte und
- d) die nervösen Erscheinungen am stärksten gewesen waren.

Nach vorheriger sorgfältiger Antisepsis der Haut des Vorderarms wurde die dazu bestimmte Vene durch einen oberhalb derselben angelegten Verband zu stärkerem Hervortreten gebracht und sodann mittelst einer bei Tierärzten üblichen Hohnadel, an deren Fußende ein in eine Erlenmeyersche Flasche tauchender Schlauch angebracht war, eingestochen. Das Ganze wurde vorher sterilisiert, so daß man sicher sein durfte, ein von außen her ganz unbeeinflusstes Blut in der erforderlichen Menge bekommen zu haben. Dasselbe wurde behufs Serumbildung 12 Stunden hindurch an einem kühlen Ort stehen gelassen, hierauf das dabei gebildete Serum gesammelt und durch Berkefeldsche Kerzen filtriert. Dasselbe wurde sodann in Fläschchen von bekanntem Rauminhalt eingefüllt und je nach Bedarf mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt.

## Tierversuche.

Die von uns zu den Versuchen gewählten Tiere waren Kaninchen, Meerschweinchen, Hunde und ein Affe. Die einzelnen Inokulationen von Serum wurden vermittelt einer gewöhnlichen Pravazschen Spritze ausgeführt; das Serum wurde in das Unterhautzellgewebe der gehörig vorbehandelten Abdominalgegend eingespritzt.

## Kaninchen No. 1.

1. Tag. Temperatur des Tieres vor der Injektion: + 38,5°.  
11 Uhr: Injektion von 1,50 ccm einer nicht filtrierten, 10-proz. Kochsalzlösung;  
6 Uhr abends: Temperatur + 40,6; das Tier zeigt sich etwas abgemattet, hat sein munteres Wesen eingebüßt und frißt mit Unlust.

2. Tag. Allgemeiner Zustand wie am Tage vorher.

6 Uhr früh:	Temperatur	+ 39,5
10 „ vorm.:	„	+ 39,9
6 „ abends:	„	+ 39,5.

3. Tag. Allgemeiner Zustand nahezu wieder normal geworden; Tagestemperatur + 38,4; dieselbe blieb in den nächstfolgenden Tagen bis auf geringe Schwankungen unverändert.

## Kaninchen No. 2.

Mit 1,50 ccm eines filtrierten Serums inokuliert — keine Reaktion; die Temperatur bleibt durch mehrere Tage nach der Injektion unverändert.

**Kaninchen No. 3.**

Injektion von 2 ccm eines filtrierten Serums; die Temperatur erfährt weder an dem Injektionstage, noch in den darauffolgenden Tagen irgendwelche bemerkenswerte Schwankungen.

**Kaninchen No. 4.**

Injektion von 3 ccm eines nicht filtrierten Serums. Auch dieses Tier zeigt keinerlei Reaktion.

**Meerschweinchen.**

Es werden 4 Meerschweinchen 0,5 bzw. 0,7, 1,00, 1,50 ccm eines filtrierten Serums eingespritzt. Die Temperatur weist durch mehrere Tage nach der Injektion keine bedeutenden Veränderungen auf.

**Hunde.**

2 Hunde bekommen 3 bzw. 5 ccm eines filtrierten Serums eingespritzt. Keinerlei Reaktion von seiten des Organismus dieser Tiere.

**Affe (*Macacus cynomolgus*).**

Am 26. Juni Temperatur in den der Injektion vorangehenden Tagen und unmittelbar vor derselben  $+ 37,5^{\circ}$ .

Um 10 Uhr vormittags werden 0,50 ccm filtrierten Serums in das Unterhautzellgewebe des Abdomens eingespritzt.

	Um 5 Uhr	nachm.	Temperatur	
Am 27. Juni	„ 8	„ früh	„	$+ 37,8$
	„ 4	„ nachm.	„	$+ 37,1$
„ 28. „	„ 7	„ früh	„	$+ 37,7$
	„ 4	„ nachm.	„	$+ 36,9$
	„ 8	„ abends	„	$+ 37,6$
„ 29. „	„ 7	„ früh	„	$+ 37,2$
	„ 4	„ nachm.	„	$+ 37,4$
	„ 8	„ abends	„	$+ 38,2$
„ 30. „	„ 7	„ früh	„	$+ 38,9$
	„ 4	„ nachm.	„	$+ 39,0$
	„ 8	„ abends	„	$+ 39,3$
„ 1. Juli	„ 7	„ früh	„	$+ 39,0$
	„ 8	„ nachm.	„	$+ 38,6$
	„ 8	„ abends	„	$+ 39,1$

Am 2., 3., 4., 5. Juli ist die Temperatur in den Morgenstunden eine nahezu normale; dieselbe erfährt jedoch nachmittags eine Steigerung bis  $+ 38,4^{\circ}$ ; in den darauffolgenden Tagen kehrt aber der normale Zustand wieder.

Aus den getreu mitgeteilten Tierversuchen geht deutlich hervor, daß dieselben in bezug auf die Hervorrufung des Sommerfiebers durchaus negativ ausgefallen sind. So kann unserem Dafürhalten nach die am 1. und 2. Juli bei Kaninchen 1 eingetretene Temperaturerhöhung wohl kaum ins Gewicht fallen, da dieselbe wahrscheinlich in einer besonderen Hypersensibilität des Tieres ihren Grund hatte, eine Annahme, die dadurch gerechtfertigt erscheint, daß die bei demselben Tiere einen Monat später vorgenommene Einführung von normalem Rindsblut ein ganz gleiches Resultat lieferte. Allerdings gab der Affe am Abend des dritten Tages nach der Injektion eine 3 Tage lang andauernde, dem Typus des Sommerfiebers sich nähernde Reaktion, allein am 2., 3., 4. und 5. Juli folgte auf diese Fieberperiode ein bei den Fällen von Sommerfieber niemals beobachtetes remittierendes Morgenfieber. Es muß daher mit Rücksicht auf den einzig dastehenden Fall und in Anbetracht der Temperatur daraus gefolgert werden, daß ein Hervorrufen des Sommerfiebers auch beim Affen nicht geglückt ist.

**Versuche am Menschen.**

Ende Juni wurde beschlossen, zu Versuchen am Menschen überzugehen, da zu dieser Zeit schon die Individuen bereit standen, die sich uns für unsere Studien zur Verfügung gestellt hatten. Wir schritten

hierbei mit der peinlichsten Vorsicht und nicht ohne eine gewisse Bangigkeit ans Werk. Denn, waren wir auch nahezu wohl sicher, daß die Umstände bei uns die gleichen waren wie bei Doerr, und daß wir eine Krankheit einimpften, die keinerlei bedenkliche Folgen nach sich zog, so standen wir doch immer einer unbekannten Größe gegenüber, der Möglichkeit nämlich, daß die beiden Krankheiten miteinander nicht identisch wären.

### Uebertragung vermittelt der Stiche von „*Phlebotomus pappatasi*“.

Es wurde zunächst — versuchsweise — dieser Weg eingeschlagen, und zwar aus nachstehenden Gründen:

- a) Weil derselbe nicht so bedenklich erschien wie der andere.
- b) Um sofort den Beweis zu erbringen, daß *Phlebotomus pappatasi* auch wirklich der Vermittler der Krankheit ist.
- c) Weil man bereits eine ziemlich große Menge von Mücken gefangen hatte, und dieselben zugrunde gegangen wären, hätte man mit dem Experimentieren noch länger gewartet.
- d) Um die Gewißheit zu erlangen, daß diese Insekten — auch bei der Art und Weise, wie wir sie gefangen hielten — tatsächlich fähig sind, sich an Menschen anzusetzen.
- e) Weil ein positives Resultat des Versuches uns eine größere Berechtigung zum Gebrauch des filtrierten Blutserums verliehen hätte.

Die weiblichen Mücken wurden mittels gewöhnlicher Roux-Röhren gefangen, welche vermöge ihrer eigenartigen Form sich dazu besonders geeignet zeigten, indem sie die Möglichkeit gewährten, mitunter selbst 2—3 Exemplare auf einmal in ein und dieselbe Röhre zu bekommen.

Um dies zu ermöglichen, mußten die bereits gefangenen Insekten in die untere Kammer befördert werden. Durch wiederholtes Umstürzen des Glases wurden dieselben sodann dahingebracht, in ein ebenso weites Rohr — von uns „Kollektor“ benannt — hineinzufallen.

Bei unseren Versuchen haben wir von dem von Doerr und noch anderen zur Anwendung gebrachten Verfahren Abstand genommen. Bekanntlich besteht letzteres darin, daß man in kleine, in der Regel für Malariastechmücken verwendete Käfige, deren Wände mit Gaze ausgekleidet sind, eine Gliedmaße desjenigen einführt, der sich den Stichen unterwerfen soll. Anstatt dessen haben wir Glasbecher benutzt, weil dieselben nicht nur die Möglichkeit einer Anlegung in einer beliebigen Körpergegend gewährten, sondern auch gestatteten, jede Bewegung der in denselben befindlichen Insekten zu verfolgen.

Um in diese Becher die gewünschte Zahl von Mücken zu bekommen, wurde ein recht einfaches Mittel ersonnen; der „Kollektor“ wurde in langsam schwingende Bewegung gebracht; dadurch verloren die Mücken die Fähigkeit, sich an die Wände anzuheften, fielen in die Unterkammer herab und wurden aus derselben in den durch einen kleinen, in der Mitte durchlöchernten Karton zugedeckten Glasbecher geschüttet.

Die Oeffnung des Kartons wurde, ebenso wie die einzelnen Röhren durch einen Gazepfropfen verschlossen, um ein Entkommen der Mücken zu verhindern. Sobald der betreffende Mann dazu bereit stand, wurde der Pfropfen entfernt, der Becher rasch auf die gewählte Körperstelle umgestürzt und der Karton weggeschoben, so daß die Mücken in unmittelbare Berührung mit der Hautoberfläche traten. Zur Entfernung

des Bechers aber wurde unter Anwendung eines nicht durchlöcherten Kartons in umgekehrter Weise verfahren.

Die wegen ihrer mehr flachen Beschaffenheit vorzugsweise dazu benutzten Körpergegenden waren die Lendengegend, die Vorderfläche der Oberschenkel und des Abdomens.

Da es bekannt war, daß diese Insekten leichter des Nachts ihre Beute überfallen, so wurde am 30. Juni 9 Uhr abends einer dieser Glasbecher mit etwa 30 darin enthaltenen, seit 2 Tagen hungernden Mücken einem an Sommerfieber Erkrankten (1. Fiebertag) angesetzt und durch  $\frac{1}{2}$  Stunde, d. i. bis überhaupt kein Blutsaugen mehr erfolgte, unberührt gelassen.

Am nächstfolgenden Tage (1. Juli) begab sich einer von uns zu C. F. (siehe No. 1, Tabelle D), weit ab vom Infektionszentrum, und ließ genau zu derselben Stunde wie am vorhergehenden Tage durch die nämlichen beim Sommerfieberkranken verwendeten Mücken Blut saugen.

Da es jedoch keineswegs angenehm war, abends mitten unter unzähligen Schwierigkeiten zu arbeiten, so wurde beschlossen, von nun an passendere Stunden zu wählen. Man ließ daher am 4. Juli bei Tage zwei weitere Patienten (No. 2 u. 3 der Tabelle D) auf die bereits beschriebene Weise durch die Mücken stechen, wobei aber das Zimmer, worin man operierte, dunkel gemacht wurde. Nach dem gleichen Verfahren wurde am 7. Juli No. 4 und am 11. Juli No. 5 gestochen.

Wie weiter unten angeführt ist, wurde unterdessen zu Uebertragungsversuchen am Menschen geschritten: Es wurde filtriertes Blutserum injiziert. Am Morgen des 11. Juli wurde der erste positive Fall konstatiert.

Wir hatten nunmehr die Ueberzeugung von dem Vorhandensein eines im Blute der Fieberkranken kreisenden Giftes gewonnen, dem die Fähigkeit zukommt, die Krankheit hervorzurufen. Unerklärlich blieb nur hierbei, wie es käme, daß bei den Individuen, die man durch die infizierten Mücken hatte stechen lassen, keine Reaktion zu erzielen war, trotzdem unsere Versuchsbedingungen offenbar die gleichen waren, wie die der österreichischen Kommission.

Allerdings waren wir schließlich zu der Einsicht gekommen, daß das von uns ausgedachte Verfahren mit erheblichen Uebelständen behaftet war. Vor allem waren die von uns verwendeten Glasbecher von 3—4 cm Durchmesser zu klein und vermochten daher nur wenige Exemplare zu enthalten. Befand sich ferner die Hautoberfläche in starker Ausdünstung, so kondensierte sich im kleinen Gefäße der Wasserdunst, was zur Folge hatte, daß ein Teil der Mücken mit den Flügeln an den feucht gewordenen Wänden des Apparates haften blieb und nicht mehr imstande war, davon loszukommen. Auch entschlüpfte beim Umstürzen des Bechers bzw. Wegschieben des Kartons manches Exemplar, andere wieder wurden gedrückt, so daß die blutsaugenden Insekten schließlich auf eine sehr geringe Zahl von bereits im ersten Tempo in den Becher gebrachten Exemplaren beschränkt waren.

Es wurden daher größere Becher benutzt (12—15 cm Durchmesser), die mit einem in der Mitte durchlöcherten Gazestück verschlossen wurden, dessen weite Maschen den Mücken das Stechen leicht gestatteten.

Wir hatten ferner bemerkt, daß in der Abteilung der fieberkranken Mannschaften im Vergleich zu den übrigen Kasernenzimmern die Zahl der daselbst vorhandenen Mücken eine außerordentlich große war. Wir suchten nun gleiche Bedingungen zu schaffen, indem wir bei den ge-



sunden Individuen eine wirksame Hauthyperämie hervorriefen, um dadurch die Mücken zum Stechen anzuregen. Zu diesem Zwecke wurde die dazu bestimmte Hautfläche rasiert, entfettet, mit heißem Wasser gewaschen und mit einem Leinwandlappen längere Zeit abgerieben. Das Verfahren hat sich denn auch bei den späteren Versuchen aufs beste bewährt.

So wurde am 12. Juli ein etwa 100 Mücken enthaltender Becher auf die gehörig vorbehandelte Abdominalfläche von No. 6 angesetzt. Die Insekten saugten gierig das Blut, wobei sie eine Quaddel, so breit wie der Durchmesser des Bechers, hinterließen, auf der die einzelnen Stiche deutlich zu sehen waren, als wären sie mit Nadeln erzeugt worden. Patient kann in den darauffolgenden Tagen seinen gewöhnlichen Verrichtungen nachgehen; am 16. Juli mittags aber beginnt er ein gewisses Unwohlsein, Unlust zur Arbeit und Kopfweh zu verspüren; gegen 5 Uhr nachmittags überfällt ihn ein Kältegefühl in allen Gliedern, um 6 Uhr tritt Fieber zu  $38,8^{\circ}$  auf und gleich darauf stellen sich heftige Schmerzen in den unteren Extremitäten und in der Lendengegend ein.

Am nächstfolgenden Tage, dem 17. Juli, 4 Uhr nachmittags erreicht die Temperatur bei Fortbestand der erwähnten Schmerzen und gesteigertem Kopfweh ihren Höhepunkt ( $39,9^{\circ}$  C).

Am 18. Juli früh 8 Uhr beträgt dieselbe  $37,9^{\circ}$  C, um 4 Uhr nachmittags  $37,3^{\circ}$  C, um 8 Uhr abends  $37^{\circ}$  C; das Kopfweh läßt nach, während die Schmerzen noch fort-dauern.

Am 19. Juli ist die Temperatur auf  $36,2^{\circ}$  C gefallen; der Kranke hat noch etwas Kopfweh und fühlt sich noch 12 Tage hindurch sehr schwach.

Am 14., 15., 18., 19. und 20. Juli wurden die üblichen, ungefähr je 100 vorher infizierte Mücken enthaltenden Becher bei weiteren 5 gesunden Individuen angesetzt. Das Resultat übertraf unsere Erwartung, denn bei allen 5 gelang es, die Krankheit hervorzurufen, und zwar sowohl mit Rücksicht auf die charakteristische, bei dem einen oder dem anderen tiefer gebliebene Temperaturkurve, als auch hauptsächlich im Hinblick auf das von der Krankheit dargebotene phänomenologische Bild.

Wir wollen hier No. 8 und No. 11, bei denen die betreffenden Temperaturen ein Maximum von  $+39,8$  bzw.  $39^{\circ}$  C erreichten und deren Symptomatologie ganz die gleiche war wie bei No. 6, übergehen und nur folgendes erwähnen: Bei C. G. (No. 7) stellten sich die gewöhnlichen Vorboten ein, d. h. starkes Kopfweh, Gefühl von großer Mattigkeit, welches letztere noch 20 Tage anhielt; bei B. M. (No. 9) prodromische Anzeichen (Kopfweh, Appetitlosigkeit, Unwohlsein) schon 30 Stunden vor Auftreten des Fiebers; bei M. C. (No. 10) prodromische Zeichen und heftige Gliederschmerzen, wobei aber der Appetit erhalten blieb und der Mann trotz seines Leidens gar nicht im Bette blieb.

Am 21., 22., 24. und 25. Juli wurden noch 4 andere Individuen gestochen, aber mit Mücken, die man unmittelbar in der Abteilung, wo die an Sommerfieber Erkrankten isoliert waren, gefangen hatte; von diesen Gestochenen lieferten zwei, d. i. P. O. (No. 13) und S. L. (No. 14), keine Reaktion, während C. R. (No. 12) und B. G. (No. 15) das charakteristische Krankheitsbild zeigten; dazu bekam No. 12 so heftige Rückenschmerzen, daß er 2 Tage lang sich im Bette gar nicht zu rühren vermochte. Schließlich wurden am 29. Juli für V. G. (No. 16) Mücken verwendet, die man in der oben genannten Abteilung gefangen und durch 10 Tage hatte hungern lassen. Auch in diesem Falle zeigte sich die bekannte Symptomatologie, und zwar noch ausgeprägter als bei den vorhergehenden Individuen.

Aus der mit den betreffenden kleinen thermographischen Tabellen versehenen Zusammenstellung D geht deutlich hervor, daß die Versuche einer Uebertragung des Sommerfiebers durch Phlebotomus-Stiche ein positives Resultat ergeben haben, und zwar mit einem so hohen Prozentsatz, daß auch nicht der geringste Zweifel darüber bestehen kann, insbesondere, wenn man von den ersten 5 sämtlich negativ ausgefallenen absehen will, für deren Mißerfolg wohl sicher unsere Unerfahrenheit, sowie die irrige Meinung verantwortlich zu machen ist, es lasse sich das Sommerfieber durch wenige Phlebotomus-Stiche auslösen. Man kann daher sagen, daß unter 11 Versuchen 9 positiv ausgefallen sind, ein Ergebnis, das man als ein durchaus überzeugendes bezeichnen kann.

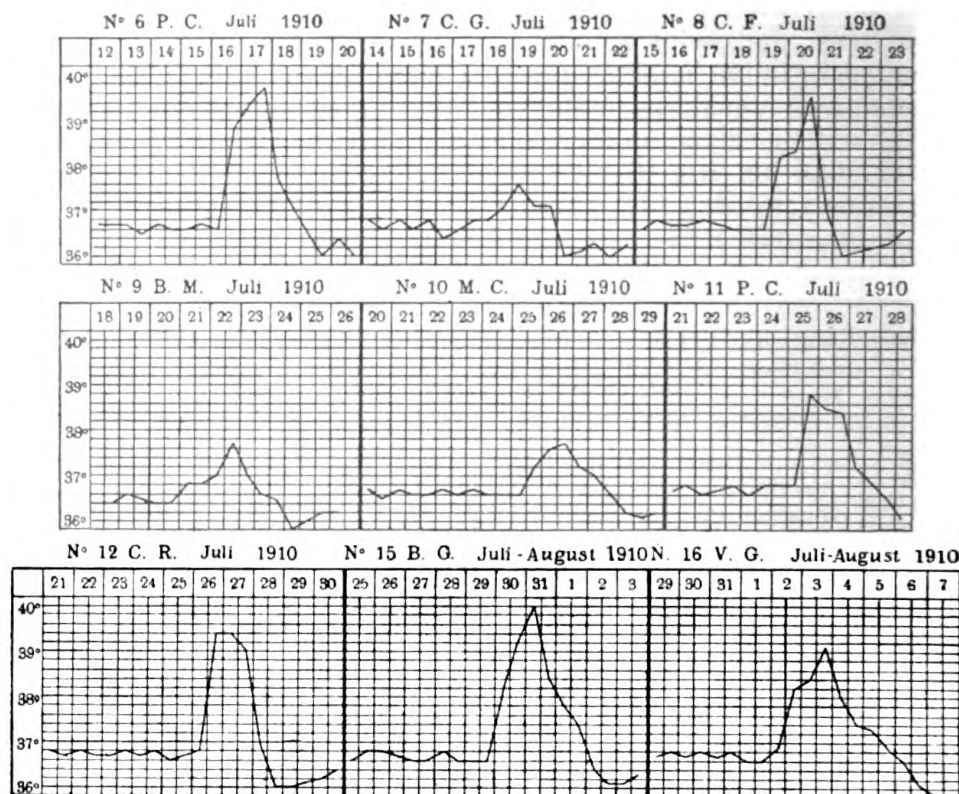
Von den 9 positiven Fällen erreichten 3 ein Fiebermaximum von  $+38^{\circ}$  C.

Wie bereits oben erwähnt, war das hervorgerufene Krankheitsbild ein derartiges, daß jeder Zweifel an einer gelungenen Reproduktion der Krankheit schwinden mußte, unter anderem auch deshalb, weil während der Epidemien unzählige Male Soldaten angetroffen werden, bei denen die Krankheit in einer milderer Form auftritt. Bemerkenswert ist es schließlich, daß bei No. 16 die Uebertragung der Krankheit durch solche Mücken erzielt wurde, die man 10 Tage lang hatte hungern lassen, ein Beweis dafür, daß *Phlebotomus* sein wirksames Virus lange zu bewahren vermag.

## Uebersichtstabelle D.

Zusammenstellung der Versuche durch „Pappataci“-Stiche: Gesunde Individuen von „Pappataci“ gestochen, nach vorheriger Infizierung dieser letzteren durch Saugen von Blut an Sommerfieber Erkrankten.

Ordn.-Zahl	Anfangs- buch- staben des Vor- und Zunamens	Tag u. Stunde, da die In- dividuen ge- stochen wurden	Tag u. Stunde, da das Fieber konstatirt wurde	Tag u. Stunde des Beginns der pro- dromischen Periode	Klinische Beobachtungen
1	C. F.	1. Juli, 9 Uhr abends			Keine Reaktion
2	F. G.	4. Juli, 2 Uhr nachm.			idem
3	B. G.	4. Juli, 3 Uhr nachm.			„
4	C. G.	7. Juli, 9 Uhr vorm.			„
5	C. S.	11. Juli, 9 Uhr vorm.			„
6	P. C.	12. Juli, 10 Uhr vorm.	16. Juli, 6 Uhr abends	16. Juli, 12 Uhr mittags	Vollständige Symptomato- logie
7	C. G.	14. Juli, 11 Uhr vorm.	18. Juli, 4 Uhr nachm.	18. Juli, 2 Uhr nachm.	Vollständige Symptomato- logie, trotzdem der Höhe- punkt des Fiebers + 37,9° gewesen ist
8	C. F.	15. Juli, 10 Uhr vorm.	19. Juli, 4 Uhr nachm.	19. Juli, 12 Uhr mittags	Vollständige Symptomato- logie
9	B. M.	18. Juli, 9 Uhr vorm.	22. Juli, 7 Uhr früh	21. Juli, 8 Uhr früh	30-stündige prodromische Periode mit kurzdauerndem starken Kopfweg
10	M. C.	19. Juli, 5 Uhr nachm.	25. Juli, 8 Uhr abends	25. Juli, 7 Uhr früh	Vollständige Symptomato- logie trotz nicht gar zu hoher Temperatur
11	P. G.	20. Juli, 6 Uhr abends	25. Juli, 4 Uhr nachm.	25. Juli, 9 Uhr vorm.	Vollständige Symptomato- logie
12	C. R.	21. Juli, 6 Uhr abends	26. Juli, 4 Uhr nachm.	26. Juli, 6 Uhr früh	Es wurden unmittelbar in den Schlafzimmern ge- fangene „Pappataci“ ver- wendet. Vollständige Symptomatologie
13	P. O.	22. Juli, 6 Uhr abends			Keine Reaktion
14	S. L.	24. Juli, 6 Uhr abends			idem
15	B. G.	25. Juli, 10 Uhr vorm.	30. Juli, 7 Uhr früh	29. Juli, 7 Uhr abends	Es wurden unmittelbar in den Schlafzimmern ge- fangene „Pappataci“ ver- wendet. Vollständige Symptomatologie
16	V. G.	29. Juli, 7 Uhr abends	2. August, 7 Uhr früh	1. August, 7 Uhr abends	Es wurden seit 12 Tagen hungernde „Pappataci“ verwendet



Thermometrische Angaben über die einzelnen Individuen, bei denen das Sommerfieber durch Pappatacistische hervorgerufen wurde. (Uebersichtstabelle D.)

### Uebertragung vermittelt filtrierte Blutserums.

Das für die Versuche am Menschen erforderliche Blutserum von an Sommerfieber Erkrankten wurde mit aller Sorgfalt gesammelt, durch Berkefeldsche Kerzen filtrierte und in zugeschmolzenen Fläschchen aufbewahrt. Durch die Nadel einer Pravazschen Spritze wird das Serum aus dem Fläschchen aspiriert und dem Patienten eingespritzt.

Die Injektionen wurden in das Unterhautzellgewebe der Deltoid- und der Kostalgegend vorgenommen, in zwei Fällen zog man es vor, intramuskulär in die Glutäen zu injizieren.

Die Uebertragungsversuche mittels infizierter Mücken waren bereits am 1. Juli eingeleitet worden; um zu jenen mittels filtrierte Blutserums zu schreiten, sollte wenigstens ein positiver Fall abgewartet werden; allein wir waren so ungeduldig, irgendein Resultat zu erzielen, daß wir am 5. Juli den Entschluß faßten, 2 Individuen (P. C. No. 1 und J. G. No. 2, Uebersichtstabelle E) je 0,50 ccm filtrierte Blutserums zu injizieren.

Bei No. 2 wurde jederlei Reaktion vermißt, hingegen stellten sich bei No. 1 am Nachmittag des 10. Juli Kopfweh und Schmerzen in den unteren Extremitäten ein; trotzdem kann Patient seinen Beschäftigungen obliegen, der Appetit blieb hierbei ein mittelmäßig guter. Der ziemlich intelligente Mann konstatiert selber mit Hilfe des Thermometers, daß seine Temperatur um 9 Uhr abends auf 38,2° gestiegen war; unsererseits konnten wir noch am nächstfolgenden Morgen das Fortbestehen des Fiebers feststellen. Ebenso sind die Schmerzen in den unteren Gliedmaßen und das Kopfweh noch immer vorhanden; trotzdem fühlt sich Patient noch imstande, leichtere Arbeiten zu verrichten. Am 12. Juli, gerade als die Temperatur zu fallen begonnen hat, stellten sich so heftige rhachialgische und Lumbalschmerzen ein, daß er im Bette bleiben mußte, ohne sich hierbei rühren zu können. Am 13. schwinden mit dem Nachlassen des Fiebers auch die Schmerzen in den unteren Gliedmaßen und das Kopfweh, während die Schmerzen in den Lenden noch immer fortbestehen; hierbei war der Appetit stets gut erhalten.

Am 8. Juli wird den Soldaten P. G. No. 3 und S. G. No. 4 (Uebersichtstabelle E) die gleiche Menge Serum wie vorher eingespritzt.

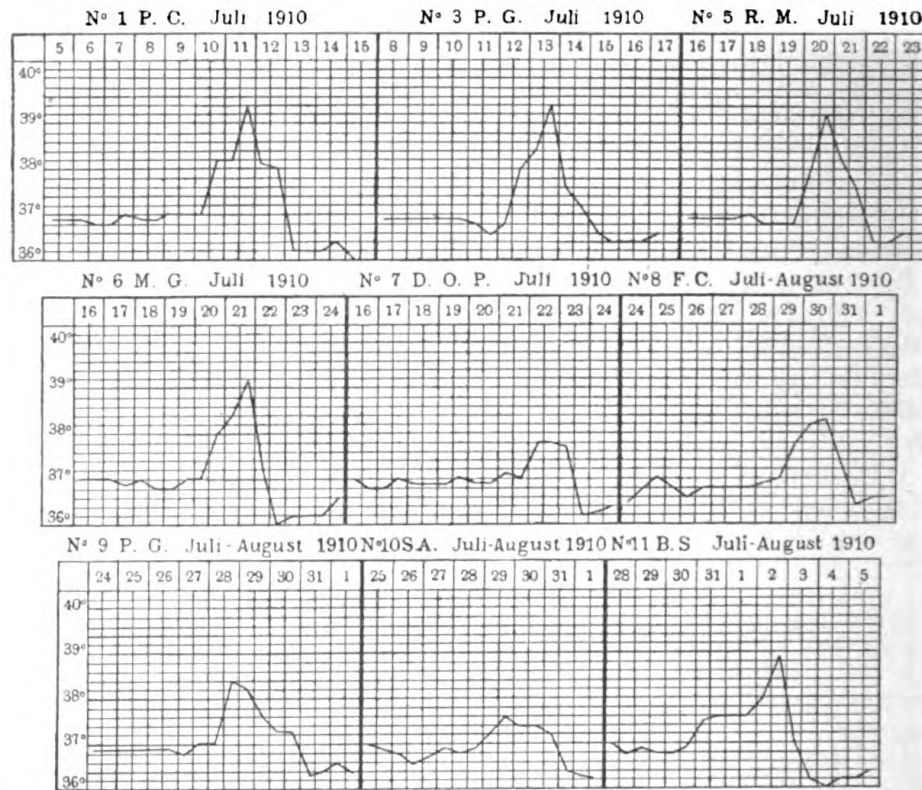
No. 4 zeigte keine Reaktion, während bei No. 3, der während der Nacht gut geschlafen hatte, am 12. Juli um 7 Uhr früh die bekannten Vorboten der Krankheit aufzutreten begannen; um 4 Uhr nachmittags erscheint Fieber mit seinem ganzen Gefolge von Begleiterscheinungen.

Im Hinblick auf diese beiden positiven Resultate hatten wir nunmehr die Ueberzeugung gewonnen, daß die Krankheit durch ein filtrierbares Virus bedingt sei. Dies veranlaßte uns, für einige Tage wieder zu den Uebertragungsversuchen mittels der Mücken zurückzukehren. Um uns aber von der Existenz eines solchen Virus noch mehr zu überzeugen und eine Statistik liefern zu können, die einwandfrei den Wert der neuen ätiologischen Anschauungen dartat und zur Hoffnung auf die Möglichkeit einer wirksamen Prophylaxe berechtigte, wurden am 16., 24. und 25. Juli bei noch anderen 7 Individuen (siehe Tabelle E) Injektionen von je 0,50 ccm eines filtrierten Serums vorgenommen. Diese weiteren 7 wurden auch sämtlich von der Krankheit ergriffen, so daß unsere Erwartung von den dabei erzielten Resultaten noch übertroffen wurde.

#### Uebersichtstabelle E.

Zusammenstellung der Versuche mit Blutserum von an Sommerfieber Erkrankten. Vollkommen gesunden, vom Infektionszentrum weit entfernt sich aufhaltenden Individuen wurden 0,50 ccm dieses Serums eingespritzt.

Ordin.-Zahl	Anfangsbuchstab. des Vor- und Zunamens	Tag u. Stunde der Injektionsvornahme	Tag u. Stunde, da das Fieber konstatiert wurde	Tag u. Stunde des Beginns der prodromischen Periode	Klinische Beobachtungen
1	P. C.	5. Juli, 9 Uhr früh	11. Juli, 8 Uhr früh	10. Juli, 6 Uhr abends	Heftige Lumbalschmerzen, kein Symptom der Krankheit vermißt.
2	J. G.	5. Juli, 9 Uhr früh	—	—	Keine Reaktion.
3	P. G.	8. Juli, 8 Uhr früh	12. Juli, 4 Uhr nachm.	12. Juli, 7 Uhr früh	Vollständige Symptomatologie.
4	S. G.	8. Juli, 8 Uhr früh	—	—	Keine Reaktion.
5	R. M.	16. Juli, 8 Uhr früh	20. Juli, 6 Uhr abends	19. Juli, 12 Uhr mittags	In der Nacht vom 18. zum 19. Schlaflosigkeit, vollständige Symptomatologie.
6	M. G.	16. Juli, 4 Uhr nachm.	20. Juli, 4 Uhr nachm.	20. Juli, 12 Uhr mittags	Appetitlosigkeit und Durst, kein Symptom der Krankheit vermißt.
7	D. O. P.	16. Juli, 6 Uhr abends	22. Juli, 8 Uhr früh	21. Juli, 9 Uhr vorm.	Trotzdem die Temperatur + 38° nicht erreicht hat, ist die Symptomatologie eine vollständige gewesen.
8	J. C.	24. Juli, 6 Uhr abends	29. Juli, 4 Uhr nachm.	29. Juli, 5 Uhr früh	Starke Abmattung im Laufe der Krankheit, deren Hervorrufung vollständig gelungen war.
9	P. G.	24. Juli, 8 Uhr früh	28. Juli, 4 Uhr nachm.	28. Juli, 5 Uhr früh	Vollständige Symptomatologie.
10	S. A.	25. Juli, 8 Uhr früh	29. Juli, 8 Uhr früh	28. Juli, 7 Uhr abends	Niedrige Temperatur bei vollständiger Symptomatologie.
11	B. S.	25. Juli, 4 Uhr nachm.	31. Juli, 8 Uhr früh	30. Juli, 10 Uhr vorm.	Vollständige Symptomatologie.



Thermometrische Angaben über die einzelnen Individuen, bei denen die Sommerfieberinfektion durch Einführung von filtriertem Blutserum an diesem Fieber Erkrankter hervorgerufen wurde. (Uebersichtstabelle E.)

Es ist wohl überflüssig, diese letzteren einzeln zu beschreiben, da dies nur zu einer unnötigen Wiederholung des bereits Dargelegten führen würde. Wir beschränken uns daher lediglich darauf, diese Resultate in eine Uebersichtstabelle zusammenzufassen, die, mit individuellen thermographischen Angaben ausgestattet, zeigen mag, wie erschöpfend und ausschlaggebend unsere Versuche gewesen sind.

Auch hier muß jedoch erwähnt werden, daß gerade so wie bei den Uebertragungsversuchen mittels der Mücken bei 2 Patienten der Höhepunkt der Fieberkurve unter  $+38^{\circ}$  geblieben ist. Wir wollen jedoch dazu bemerken, daß — von der Fieberkurve abgesehen — die Symptomatologie sowohl in der prodromischen Periode, als auch im Verlaufe der Krankheit selbst und in der Rekonvaleszenz eine typische ist. Für uns aber hat die Temperaturkurve, mag dieselbe auch eine niedrige sein, wohl mehr als die Symptomatologie eine grundlegende Bedeutung, insofern erstere ganz ähnlich derjenigen von Individuen ist, die von der Krankheit befallen wurden. Die Mißerfolge in den Fällen 13 und 14 der Tabelle B, sowie in den Fällen 2 u. B. der Tabelle E sind aller Wahrscheinlichkeit nach auf eine natürliche Immunität der betreffenden Individuen zurückzuführen, was uns übrigens nicht zu verwundern braucht, da eine ganze Reihe von im Laufe der einzelnen Epidemien gemachten Erfahrungen uns belehrt, daß manche Individuen verschont geblieben sind, trotzdem bei denselben die allergünstigsten Vorbedingungen für ein Befallenwerden vorhanden waren.

### Inkubation.

Und nun einige Worte über die Inkubation, die wir im allgemeinen Teil der vorliegenden Mitteilung aus dem Grunde übergangen haben, um dieselbe später nicht nur epidemiologisch, sondern auch experimentell begründen zu können.

Bei genauerer Betrachtung der Fälle von experimentell erzeugter Fieberkrankheit — mag dies nun durch Injektion von Blutserum oder durch Mückenstiche erzielt worden sein — läßt sich als zweifellos feststellen, daß die Inkubationsperiode der in Rede stehenden Krankheit 4—5 Tage dauert.

Aus den zu den Tabellen B und E gehörenden Tabellchen, in denen die einzelnen Temperaturen von Beginn des Versuches an verzeichnet sind, geht die Dauer der Inkubationszeit klar und deutlich hervor.

Mit dieser experimentellen Feststellung stimmt eine Reihe von klinischen und epidemiologischen Erfahrungen in weitem Maße überein.

Das Kavallerieregiment Montebello befand sich unter besonderen Verhältnissen, es war nämlich auf 3 Kasernen verteilt, von denen eine (Principe Amedeo) infiziert, die zwei anderen (Vittorio Bottego und Emmanuele Filiberto) immun waren. Es war uns schon seit 1908 aufgefallen, daß wenn Mannschaften aus den beiden verschont gebliebenen Kasernen aus irgendeinem Grunde in der Kaserne Principe Amedeo übernachten mußten, dieselben nicht vor dem 4. Tage erkrankten. Es wurden so fast alle jene Soldaten befallen, die im Pferdespital Wochendienst hatten, ebenso mancher von den an anderen Krankheiten in der Kaserne daniederliegenden bzw. am Kasernentor Wacht habenden. Bekannt ist es ferner, daß bei den einzelnen Regimentern ein alltägliches Kommen und Gehen von Individuen stattfindet; bei den Neuangekommenen zeigten sich gleichfalls die ersten Symptome der Krankheit nicht vor dem 4. Tage nach ihrer Ankunft. So erkrankten nacheinander zwei aus Ferrara gekommene Offiziersburschen, drei vom Urlaub zurückgekehrte Soldaten und neun aus Piacenza zugekommene Korporaleleven. Noch unzählige andere Erfahrungen ließen sich hier anführen, die sämtlich unsere Angaben stützen und bekräftigen würden.

Allein wir halten es für völlig nutzlos, darauf noch weiter einzugehen, da wir ja eine reichhaltige Zusammenstellung von Versuchen vorlegen, die ausnahmslos auf eine Inkubationsdauer von 4—5 Tagen hindeuten.

Nur möchten wir auf einen hochwichtigen Umstand aufmerksam machen, der nicht nur zu einer solchen Behauptung berechtigt, sondern auch einen Beweis dafür liefert, daß Phlebotomus tatsächlich, ja vielleicht ausschließlich, das Umsichgreifen der Krankheit vermittelt.

Im Laufe einer Sommerfieberepidemie unterliegt die Zahl der Fälle nur geringen täglichen Schwankungen; tritt aber eine mit Temperaturerniedrigung einhergehende atmosphärische Störung ein, so erfährt zwar besagte Zahl durch 4—5 Tage keine Aenderung, nimmt aber nach dieser Zeit sofort merklich ab.

Wie ist diese interessante und konstante Erscheinung zu erklären?

Es ist bei der Biologie des *Phlebotomus pappatasii* bereits erwähnt worden, daß derselbe sich dem Winde und den Temperaturerniedrigungen gegenüber nicht widerstandsfähig zeigt, indem er sich hinter Gesimse, Vorsprünge, in Wandrisse, in die Fugen der Plafondbalken usw. zu verkriechen sucht.



Wenn nun also wegen einer atmosphärischen Störung die Mücken ihre Schlupfwinkel nicht verlassen und daher kein Blut saugen, so können noch 4—5 Tage später keine neuen Erkrankungsfälle vorkommen. Dies im allgemeinen, denn vereinzelte Fälle gibt es selbstverständlich doch immer, unter anderem auch deshalb, weil wegen ihrer verschiedenen Lage nicht alle Schlaflokale den Aenderungen der Außenluft in gleichem Maße ausgesetzt sind.

#### Schlusssätze.

Auf Grund der bisher dargelegten experimentellen Versuche erscheint folgendes als unanfechtbar erwiesen:

- 1) Der Krankheitserreger ist beim italienischen Sommerfieber ein filtrierbares Virus;
- 2) das von Mann zu Mann dieses Virus übertragene Agens ist — wahrscheinlich einzig und allein — „*Phlebotomus pappatasii*“;
- 3) die Inkubationsperiode der Krankheit hat eine Dauer von 4 bis 5 Tagen;
- 4) bei *Phlebotomus* bewahrt das Gift durch längere Zeit (10 Tage) seine Wirksamkeit;
- 5) zur Hervorrufung der Krankheit sind zahlreiche Stiche dieser Mücken erforderlich.

Unsere Versuche haben somit den Beweis erbracht, daß das italienische Sommerfieber identisch ist mit dem durch Mückenstiche erzeugten der Herzegowina.

In seinen jüngsten Arbeiten hat sich Prof. Gabbi dahin ausgesprochen, daß die klinischen Erfahrungen zur Annahme einer solchen Identität berechtigten. Bei aller Hochachtung für den hervorragenden Fachmann, erlauben wir uns zu bemerken, daß vom experimentellen Standpunkte aus selbst die an und für sich gerechtfertigten Anschauungen einen nur bescheidenen Wert besitzen, während nur den Tatsachen eine ausschlaggebende Bedeutung zukommt.

Zum Schlusse noch ein Wort über die dieser Krankheit beizulegende Benennung. Wir halten es nicht für treffend, dieselbe als Dreitagsfieber zu bezeichnen, da ja auch das gleichfalls drei Tage dauernde und von manchen mit unserem Sommerfieber verwechselte Denguefieber so benannt wird.

In Oesterreich und England bezeichnet man dieses Fieber mit dem Namen „Papataci-Fieber“, bzw. „*Phlebotomus fever*“. Auch mit dieser Benennung können wir uns kaum einverstanden erklären, da uns die Beschaffenheit des infizierenden Agens noch unbekannt und *Phlebotomus* nur der Vermittler der Erkrankung ist. Malaria heißt ebensowenig „Fieber durch *Anopheles*“ als das Denguefieber „Fieber durch *Culex fatigans*“; deshalb glauben wir, es sei das in Frage stehende Fieber noch weiter fort als „Sommerfieber“ zu bezeichnen.

Herrn Prof. E. Bertarelli, der uns mit seinem Wissen und Können lebenswürdigst beigestanden, sprechen wir an dieser Stelle unseren tiefgefühltesten Dank aus.

Parma, 1911.

## Nachtrag.

Wie in obiger Arbeit ausdrücklich betont wird, bezweckt dieselbe — wie dies seinerzeit Birt in Malta und Kreta getan — für die Identität des italienischen Sommerfiebers mit dem von Doerr als „Pappataciefieber“ bezeichneten dalmatischen bzw. herzegowinischen Fieber einen experimentellen Beweis zu erbringen.

Obige Arbeit war bereits in italienischer Sprache erschienen, als zu unserer Kenntnis gelangte, daß Prof. Doerr im ersten Teil dieser Zeitschrift (Bd. 58. H. 5. Mai 1911) gegen unsere über dasselbe Thema in Bd. 57. 1911. H. 3 publizierte vorläufige Mitteilung manches eingewendet hatte. Wir halten es für unsere Pflicht, hier eine Erklärung folgen zu lassen, denn ein Stillschweigen unsererseits würde ebensoviel heißen, als sich schuldig bekennen.

Nach Prof. Doerr's Meinung ruft unsere vorläufige Mitteilung den Eindruck hervor, als ob wir die ersten gewesen wären, die an eine Identität des herzegowinischen Fiebers mit dem italienischen Sommerfieber gedacht haben, während er doch bereits in seiner Arbeit sich dahin ausgesprochen hatte, daß im Hinblick auf die Symptomatologie eine solche Identität außer Zweifel sei. Wir erlauben uns daran zu erinnern, daß unsere vorläufige Mitteilung 1910 abgefaßt wurde und daß die Absicht, bezüglich der Existenz eines „Pappataciefiebers“ eine Priorität zu beanspruchen, uns so fern gelegen, daß wir nicht nur auf die Untersuchungen Doerr's hingewiesen, sondern auch die Mitteilungen Grassis (20. Dezember 1908) und (Juni 1909) erwähnt haben, welche Autoren schon vor uns dieselbe Vermutung geäußert hatten. Ferner könnte nach Doerr's Ansicht aus unserem kurzen Aufsatz geschlossen werden, daß nur wir einen Beweis für die Filtrierbarkeit des Virus und für dessen Uebertragbarkeit auf den Menschen geliefert haben. Nun, wir hatten uns keineswegs zur Aufgabe gestellt, die von seiten der medizinischen Presse eingehend besprochene und daher hinlänglich bekannte und gewürdigte Arbeit von Doerr, Franz und Taussig zu rezensionieren; wir hielten es für hinreichend, die damals erfolgte Ernennung einer zum Studium des Fiebers eingesetzten Kommission einfach zu erwähnen und weiter nichts hinzuzufügen, als daß wir uns dem von besagter Kommission abgegebenen Gutachten — es handle sich um ein filtrierbares Virus — anschlossen. Darum haben wir uns auf Einzelheiten nicht eingelassen, um so mehr, als es wohl auch hätte sein können, daß unser Sommerfieber nicht ganz das gleiche gewesen wäre. Wir können daher nicht begreifen, was Prof. Doerr veranlaßt haben mag, gegen unsere kurze Mitteilung Stellung zu nehmen, nachdem wir uns ja in keiner Weise erlaubt haben, seine Filtrationsversuche irgendwie anzuzweifeln.

Schließlich meint Prof. Doerr — um hier von anderen minder schwer wiegenden Einwänden abzusehen — wir hätten alle Details seiner experimentellen Technik benutzt, ohne das geringste davon zu erwähnen. Allerdings findet sich in der inkriminierten kurzen Mitteilung die von uns angewendete — von derjenigen der Herren Doerr, Franz und Taussig hier und da etwas abweichende — Technik nicht näher beschrieben. Allein, wäre dieselbe auch wirklich mit der von diesen Autoren befolgten identisch, so dürfte dies kaum verwundern, da ja ein schon bekannt gewordenes wissenschaftliches Vorgehen Gemeingut eines jeden ist. Dazu kommt noch, daß die von Doerr befolgte Methode

nichts Eigenartiges an sich hat, denn die Filtrierbarkeit des Serums ist seit lange bekannt, wie beispielsweise die Blutfärbungsmethode; ebenso bekannt wie die kleinen Gazekäfige bei Malaria, noch bevor Doerr dieselben zu seinen Versuchen mit „Pappataci“ verwendet hatte. Unsere vorläufige Mitteilung hatte also vor allem den Zweck, unsere Priorität zu betonen bezüglich des Nachweises, das das italienische Sommerfieber nichts anderes ist als Pappataciefieber, ähnlich dem herzegowinischen. Das ist auch der Grund, warum wir uns einzig und allein mit dem befaßt haben, was geeignet war, uns zu einem solchen Nachweis zu verhelfen.

#### Literatur.

- Rondani, Sopra una specie di insetto dittero. Memoria 1<sup>a</sup>. Parma 1840.  
 — —, Italicæ generis flebotomi ecc. ecc. (Extr. d. Annal. soc. entomolog. de France. 2. Ser. II. T. 1. 1843.)  
 Rho, Contributo allo studio delle piressie più comuni a Massaua. (Giorn. med. del R. esercito 1886.)  
 Pick, Zur Pathologie und Therapie einer eigentümlichen endemischen Krankheitsform. (Wien. med. Wochenschr. 1886. No. 33—34.)  
 — —, Idem. (Prag. med. Wochenschr. 1887. No. 43.)  
 Saggini, Relazione sanitaria annuale del Presidio die Bologna. 1888.  
 Pasquale, Nota preventiva sulle febbri remittenti climatiche. (Giorn. med. del R. esercito. 1889.)  
 — —, Studio etiologico e clinico delle malattie febbrili più comuni a Massaua. (Giorn. med. del R. esercito 1891.)  
 Karliński, München. med. Wochenschr. 1889.  
 Petella, Le febbri climatiche di Massaua. (Giorn. med. del R. esercito 1891.)  
 Durelli, Comunicazione alla Società Medica di Bologna sulla febbre estiva. 1894.  
 — —, Sulla febbre estiva. (Bollett. d. scienze med. Ser. 6. Vol. 5. 1895.)  
 Cevaschi, Sopra un tipo speciale di febbre dominante in Bologna. Giorn. med. del R. esercito 1895.)  
 Sforza, Sull'etiologia delle febbri estive dominanti annualmente in Bologna. (Giorn. med. del R. esercito. 1896.)  
 Loschi, Le febbri a forma tifosa dominanti nella guarigione di Verona. (Giorn. med. del R. esercito. 1896.)  
 Gambara, Contributo allo studio di una febbre di tipo speciale presentatasi in diverse località della città di Parma nella stagione estiva. Nota preventiva. Parma 1898.  
 Gabel, Eine akute Infektionskrankheit. (Wien. med. Wochenschr. 1900. No. 4.)  
 Graham, Mosquitoes and dengue. (Journ. of trop. Med. 1902.)  
 Ferrero di Cavallerleone, Relazione di una epidemia di febbre tra le truppe del genio alloggiate a Castel S. Angelo. 1902.)  
 Polverini, Malaria in India. (Il Morgagni. 1904.)  
 Taussig, Die Hundskrankheit in der Herzegowina. (Wien. klin. Wochenschr. 1905.)  
 Rub, Beobachtungen über das Virus etc. (Arch. f. Hyg. Bd. 49.)  
 Landsteiner, Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Ref. Bd. 38.  
 Grassi, Ricerche sui flebotomi. Roma 1907.  
 — —, Intorno a un nuovo flebotomo. (Atti d. R. Accad. d. Lincei. Vol. 17. 1908.)  
 Otto, Gelbfieber. (Pathog. Mikroorg. 1907. H. 1.)  
 Ashburn and Craig, Exp. invest. regard. the etiology of dengue-fever. (The Mil. Surg. 1907. August.)  
 — —, Phil. Journ. of Science. 1907. May.  
 Mense, Malattie dei paesi tropicali. 1907.  
 Rossini, Note di patologia cretense. (Giorn. di med. milit. 1907.)  
 Mendini, Corriere sanitario. 1907. novembre.  
 Mendes, Contributo allo studio della febbre estiva nei militari. (Giorn. med. del R. esercito. 1907.)  
 Mennella, Della febbre estiva. (Giorn. di med. milit. 1908.)  
 Nichols, The mil. Surg. 1908. Mai.  
 Rogers, Lancet. 1908. No. 4377.  
 Doerr, Ueber ein neues invisibles Virus. (Berlin. klin. Wochenschr. 1908. No. 41.)  
 Mühlens, Ueber einige fieberhafte Tropenkrankheiten. (Berlin. klin. Wochenschr. 1908. No. 36.)  
 Doerr u. Russ, Weitere Untersuchungen über das Pappataciefieber. (Arch. f. Schiffshyg. u. Tropenhyg., Bd. 13. 1909.)

- Sergent, Les insectes piqueurs e suceurs. Paris 1909.  
Doerr, Franz u. Taussig. Das Pappataciefieber. Wien (Deutsche) 1909.  
Memmo, La febbre estiva nei militari è la febbre da pappataci? (Giorn. d. med. milit. 1909. giugno.)  
Blanchard, A propos des Phlebotomus. (Extr. d. Bull. soc. entomolog. de France. 1909. No. 11.)  
Birt, Phlebotomus fever in Malta and Creta. (Journ. of the Royal army med. Corps. 1910.)  
Bertarelli, La febbre da pappataci (Rivista d'igiene e sanità pubblica, 1910 giugno..)  
Napolitani e Tedeschi. Ricerche sperimentali sulla etiologia della febbre estiva. Nota preventiva. (Policlinico, sezione pratica, 1910. agosto.)  
—, Ricerche sperimentali sulla etiologia della febbre estiva. (Bolletino dell'accademia medica di Parma. 1910. fasc. 9.)  
Gabbi, Una epidemia di febbre di tre giorni a Messina e sulla costa Calabria. (Pathologica. 1910. settembre.)  
—, Sulla febbre dei tre giorni o febbre da pappataci. (Pathologica. 1910. novembre.)  
—, Malattie tropicali dell'Italia meridionale e della Sicilia. Messina (G. Principato) 1911.  
Franz u. Kolar, Zur Pathologie und Therapie des Pappataciefiebers. Leipzig (J. A. Barth) 1910.  
Tedeschi e Napolitani, Experimentelle Untersuchungen über die Aetiologie des „Sommerfiebers“. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 57. 1911. p. 208)  
De Napoli, Sulle febbri estive o dei tre giorni dominanti in Bologna. (Giorn. di med. milit. 1911. febbraio.)

*Nachdruck verboten.*

## Recherches sur la spirochétiose des poules de Tunisie et sur son agent de transmission: *Argas persicus* Fischer.

[Institut d'Hygiène et de Parasitologie de l'Université de Lausanne.]

2<sup>d</sup> Mémoire.

Par **B. Galli-Valerio.**

Avec 4 figures.

Depuis la publication de mon premier mémoire sur la spirochétiose des poules de Tunisie<sup>1)</sup>, de nombreux travaux ont paru sur cette intéressante maladie, travaux qui démontrent comme cette affection est répandue sur presque toute la surface de la terre. Ainsi on l'a signalée au Sénégal<sup>2)</sup>, au Soudan français<sup>3)</sup>, au pays des Somali<sup>4)</sup>, au Kameroun<sup>5)</sup>, au Queensland<sup>6)</sup>, dans l'Etat de Victoria<sup>7)</sup>, à la Martinique<sup>8)</sup> et en Roumanie<sup>9)</sup>. Dans toutes ces contrées la spirochétiose est transmise par *A. persicus* Fischer sauf dans l'Etat de Victoria ou elle l'est par *A. victoriensis* Sweet, forme très analogue si non identique à la précédente. Dans mon premier mémoire, j'avais avancé l'idée que les 2 spirochètes des oiseaux décrites sous les noms de *Sp. anserina* Sacharoff et de *Sp. marchouxi* Nuttall (syn. *Sp. galli-*

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 50. 1909. p. 189.

2) Bull. de l'Inst. Pasteur. 1909. p. 526.

3) Idem. p. 528.

4) Idem. p. 926.

5) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 45. 1910. p. 522.

6) Bull. de l'Inst. Pasteur. 1910. p. 788.

7) Idem. 1911. p. 125.

8) Idem. 1909. p. 519.

9) Idem p. 927.

narum Blanchard) ne constituent qu'une seule espèce, qui doit donc porter le nom de *Sp. anserina* Sacharoff. Cette idée n'est pas partagée par Brumpt<sup>1)</sup> qui arrive à créer 4 espèces: *Sp. anserina* Sacch., *Sp. gallinarum* Steph. et Christ., *Sp. neveuxi* Brumpt et *Sp. nicollei* Brumpt, espèces auxquelles Balfour<sup>2)</sup> en ajouterait une 5<sup>e</sup> *Sp. granulosa penetrans* du Soudan égyptien.

Je persiste, pour mon compte, dans l'idée de l'unité, en admettant, tout au plus, l'existence de races ou de variétés. Cette véritable manie de créer de nouvelles espèces sur des caractères extrêmement variables, encombre la littérature d'une foule de noms inutiles, qui devront, sans aucun doute, disparaître bientôt. Qu'on se rappelle tout le travail fait pour séparer *T. castellani* de *T. gambiense*; aujourd'hui reconnus par tous comme constituant une espèce unique. Bien d'autres trypanosomes devront probablement être réunis dans une espèce unique: Ainsi Bruce, Hamerton, Bateman et Mackie<sup>3)</sup> considèrent *T. vivax* identique à *T. cazalboui*; Roudsky<sup>4)</sup> à la suite des modifications qu'on peut faire subir à *T. Lewisi*, se demande si tous les trypanosomes des rongeurs ne constituent pas une seule espèce: *T. Lewisi*. Enfin je rappellerai qu'après avoir longtemps voulu séparer *L. infantum* de *L. donovani*, Nicolle même reconnaît aujourd'hui qu'on se trouve en présence d'une espèce unique, qui doit porter la 2<sup>e</sup> dénomination<sup>5)</sup>.

Or tous les derniers travaux parus sur la spirochétiose des oiseaux, parlent en faveur de mon idée. Déjà le fait que cette maladie, si nous faisons exceptions pour l'île de Chypre où elle est transmise par *A. reflexus*, est partout transmise par *A. persicus* et une ou deux de ses variétés, de sorte que la distribution géographique de la spirochétiose des oiseaux correspond à celle d'*A. persicus*, doit nous porter à penser qu'il s'agit d'une espèce unique de spirochète. A côté de ça on n'a rien observé de nouveau dans la morphologie du spirochète, qui puisse permettre de le différencier en plusieurs espèces. Si la forme du Soudan égyptien semble plus souvent que les autres formes, donner les granulations intraglobulaires, ce caractère n'est pas du tout suffisant pour créer une nouvelle espèce: *Sp. granulosa penetrans*, comme le voudrait Balfour. En effet nous savons que v. Prowazek<sup>6)</sup> a vu dans la spirochétiose brésilienne le parasite pénétrer dans les globules rouges, que moi même<sup>7)</sup> j'ai signalé la présence des corpuscules de Balfour dans les hématies des poules infectées avec le spirochète de Tunisie et que Bouet<sup>8)</sup> a vérifié la même chose dans la spirochétiose du Soudan français. Quant aux résultats des inoculations sur les différents oiseaux et des immunités réciproques, ils sont tellement contradictoires et tellement variables, qu'on ne peut pas s'en servir pour une différenciation. Ainsi Dschunkowsky et Luhs<sup>9)</sup>, qui ont retrouvé en Transcaucasie la spirochétiose des oies de Sacharoff, ont, avec ce virus, infecté non seulement les oies, mais les jeunes poulets, les dindons, les canaris, les corneilles, les moineaux, les alouettes, mais pas les poules

1) Brumpt, E., Précis de Parasitologie. Paris 1910. p. 108.

2) Journ. of tropic. Med. 1911. p. 113.

3) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 49. 1911. p. 360.

4) Bull. de l'Inst. Pasteur. 1911. p. 284.

5) Archives de l'Inst. Pasteur de Tunis. T. 2. 1911. p. 125.

6) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 40. 1908. p. 822.

7) Travail cité.

8) Bull. de l'Inst. Pasteur. 1909. p. 528.

9) Bull. de l'Inst. Pasteur. 1910. p. 314 et Journ. of trop. Med. 1909. p. 292.

adultes ni les pigeons. Balfour<sup>1)</sup> constate que la spirochétiose des poules du Soudan égyptien, existe aussi chez les oies et dit que Wenyon l'a trouvée chez les pintades sur le Nil blanc. Le pigeon est aussi réfractaire à cette forme<sup>2)</sup>. Brumpt<sup>3)</sup> dit que la spirochétiose des poules du Sénégal, est transmissible à canards, oies et *Padda oryzivora* et celle des poules du pays des Somali<sup>4)</sup> à oies, *P. oryzivora*, moineaux, mais pas au pigeon. La spirochétiose des poules de Roumanie, est transmissible, suivant Mezinescu et Calinescu<sup>5)</sup> à canards et oies; et celle du Brésil, suivant Fülleborn<sup>6)</sup> à canaris et oies. Ces observations donc confirment celles que j'avais citées dans mon premier mémoire, sur la transmissibilité de la spirochétiose des poules aux oies et vice-versa et à une série d'autres espèces d'oiseaux. En même temps, aucune des formes étudiées semble capable d'infecter le pigeon, chose confirmée aussi par moi pour la spirochétiose de Tunisie. Les différences qu'on observe, sont surtout dues à l'adaptation du spirochète à vivre chez une espèce donnée. Nous savons en effet que le spirochète des oiseaux subit de profondes modifications de virulence en passant, dans une même espèce, chez des jeunes ou des adultes, de sorte que, comme observe Blaizot<sup>7)</sup> au sein d'une même espèce, les jeunes et les adultes paraissent se comporter comme des animaux d'espèces étrangères.

Les symptômes de la maladie sont partout identiques. La récurrence, signalée par les uns, non signalée par les autres, existe probablement dans toutes les formes. Ainsi, tandis que Comte et Bouquet<sup>8)</sup> ne l'avaient pas signalée dans la spirochétiose de Tunisie, Blaizot<sup>9)</sup> l'y a observée comme elle a été observée par Bouet<sup>10)</sup> dans la forme du Soudan français et par Balfour<sup>11)</sup> dans celle du Soudan égyptien.

Que dire des réactions d'immunité? Tandis que Brumpt<sup>12)</sup> se base sur la non-immunité réciproque pour créer ses espèces, Bouet<sup>13)</sup> expérimentant avec les formes du Sénégal, du Soudan français et du Brésil, constate contrairement à Brumpt, qu'il y a immunité réciproque et considère toutes ces formes comme identiques.

De tout ce qui précède, je me crois toujours plus autorisé à maintenir mon idée, que les spirochétioses des oiseaux de basse-cour jusqu'à maintenant, sont déterminées par une seule espèce de spirochète: *Sp. anserina* Sacch.

Mes nouvelles expériences sur la spirochétiose des poules de Tunisie, ont été faites en employant des *Argas persicus*, qui m'ont été obligeamment envoyés vivants de Kairouan (Tunisie) par Mr. le Dr. Santschi et de Houmt-Souk (Ile de Djerba) par Mr. Weiss.

- 1) Bull. de l'Inst. Pasteur. 1909. p. 517.
- 2) Journ. of trop. Med. 1909. p. 285.
- 3) Bull. de l'Inst. Pasteur. 1909. p. 926.
- 4) Idem.
- 5) Idem. p. 927.
- 6) Idem. p. 208.
- 7) Bull. de l'Inst. Pasteur. 1910. p. 316.
- 8) Arch. de l'Inst. Pasteur de Tunis. 1908. p. 163.
- 9) Idem. 1910. p. 53.
- 10) Bull. de l'Inst. Pasteur. 1909. p. 526.
- 11) Journ. of trop. Med. 1909. p. 285.
- 12) Bull. de l'Inst. Pasteur. 1909. p. 526.
- 13) Travail cité.



**1<sup>e</sup> Série. A. persicus de Kairouan.****a) Exemplaires reçus le 2. IV. 1910.**

Exp. I. Jeune poule No. 1. Point de spirochètes. Temp. 41° C. 22 IV. 1910. Piquée par 7 *A. persicus* jeunes qui restent fixés d'1/4 d'h. à 1 h. Elle n'a rien présenté. Examen du sang: négatif; sauf une légère leucocytose. 20 VI. Piquée par 9 *Argas* qui restent fixés de 8' à 1 h. 25'. Point de troubles. Les examens du sang montrent légère leucocytose et par ci par là dans les hématies, des corpuscules ovoïdes ou arrondis, parfois disposés par deux colorés en violacé par le *Leishman*, corpuscules analogues à ceux que j'ai signalé dans mon premier mémoire.

**b) Exemplaires reçus le 7. IV. 1910.**

Exp. II. Jeune poule No. 2. Point de spirochètes. Temp. 42° C. 23 V. 1910. Piquée par 8 *Argas* qui restent fixés de 16' à 1 h. 20'. Piquée par 7 *Argas* qui restent fixés de 7' à 45'. Pas de troubles. Examen du sang négatif.

Exp. III. Jeune poule No. 1 de l'exp. I. Point de spirochètes. Temp. 42° 1 C. 6 VI. 1910. Piquée par 15 *Argas*, qui restent fixés de 15' à 1 h. Dans les jours suivants la température oscille entre 41° 5—42° 3—42° 7 C. 20 VI. La poule reste couchée sur le ventre. Examen du sang négatif. Cette poule est morte la nuit au 5 ou 6 octobre 1910, mais ni les frottis du sang et des organes colorés au *Leishman*, ni les coupes traitées par le procédé de Volpino-Levaditi m'ont permis de constater une infection à spirochètes.

**2<sup>e</sup> Série. Argas persicus de Houmt-Souk (Ile de Djerba, Tunisie).****a) Exemplaires reçus le 19 II. 1910.**

Exp. I. Vieux coq No. 3. Point de spirochètes. Temp. 41° C. 22 II. 1910. Piqué par 8 *Argas* qui restent fixés 1/2 à 1 h. Point de troubles. Examens du sang négatifs. 11 IV. Piquée par 4 *Argas* qui restent fixés d'1/4 à 1 h. et 1/4. Point de troubles, examen du sang négatif.

Exp. II. Jeune poule No. 4. Point de spirochètes. Temp. 40°. 11 IV. 1910. Piquée par 9 *Argas* qui restent fixés de 30' à 35'. 14 V. La poule est triste. Temp. + 40° 5. 15. V. L'animal est couché sur le flanc sans pouvoir se relever. Examens du sang: Forte leucocytose mais point de spirochètes. 16 IV. Même état. Examens du sang: Point de spirochètes, mais dans quelques hématies corpuscules ovoïdes ou ronds parfois par deux, colorés en rouge-violacé. 18 IV. Crête cyanosée. L'animal reste couché sur son ventre. Examens du sang: Point de spirochètes. 20 IV. La poule est trouvée morte. Autopsie: Crête cyanosée. Fort amaigrissement. Nombreux kystes à *Laminosioptes cysticola* dans le conjonctif sous-cutané. Pas d'autres lésions. Examens microscopiques des frottis: Sang: Forte leucocytose, mais point de spirochètes. Organes: Point des spirochètes. Examen des coupes au Volpino-Levaditi: négatif, sauf dans celles du foie où l'on remarque quelques corpuscules ronds ou ovoïdes, jaune-brunâtres, analogues à ceux vus par le *Leishman* dans les hématies le 16 IV. Des cultures faites avec le sang, le foie et la rate sont restées stériles. Pour éliminer la possibilité d'une infection due à un virus filtrable, j'ai filtré sur bougie Silberschmidt un mélange de coagulums pris dans le coeur, de foie et de rate triturés avec du sable de quartz et dilués dans la solution physiologique. Le liquide filtré a été inoculé à la dose d'1/4 de cc. dans les muscles pectoraux du coq No. 3 (Exp. I, 2<sup>e</sup> série). Le résultat a été complètement négatif.

**b) Exemplaires reçus le 6 VIII. 1910.**

Exp. III. Jeune poule No. 2 de l'exp. II le série. Point de spirochètes. Temp. 41° 7 C.

7 X. 1910. Piquée par 6 *Argas* qui restent fixés de 15' à 1 h. 11 X. Plumes hérissées. Temp. 41° 7. Examen du sang négatif. 21 X. Piquée par 2 *Argas* qui restent fixés de 13' à 20'. Point de troubles, examen du sang négatif. 11 XI. Piquée par 3 *Argas* qui restent fixés de 30' à 35'. 18 XI. Crête pâle, amaigrissement. Temp. 41° 2. Examen du sang négatif. Morte le 13 I. 1911. par accident. Les examens du sang et ceux des organes traités au Volpino-Levaditi sont absolument négatifs.

**c) Exemplaires reçus le 21 I. 1911. Il sont gorgés de sang.**

Exp. IV. Jeune coq No. 5. Point de spirochètes. Temp. 41° 5. Poids 1305 gr. 6 II. 11. Piqué par 9 *Argas* qui restent fixés de 8' à 1 h. 15'. 13 II. Amaigrissement (poids 1135). Temp. 41° 5. Crête pâle. Plumes ébouriffées. 14 II. Examen du sang: Forte leucocytose. Très nombreux spirochètes mobiles à 5—6—10 ondulations, à extrémités effilées. Dans les préparations, colorées au *Leishman*, on remarque la présence d'un certain nombre d'exemplaires dont l'une des extrémités est en voie de division

longitudinale (fig. 1)<sup>1</sup>). On pourrait penser à un accollement de deux spirochètes, mais il est absolument impossible de constater une trace quelconque d'accolement dans la partie du corps non divisée, même en employant de très forts grossissements (ob. imm. hom. 2 mm., oc. comp. 18). Le soir, le coq reste couché sur le ventre, dans une espèce d'assoupissement. Même touché il ne réagit pas. Les plumes sont ébouriffées. Mort la nuit du 14 au 15 II. Autopsie: Crête et muqueuses très pâles. Fort amaigrissement. Rate environ 3 fois plus grosse que celle d'un coq normal, de la même taille.

Examen microscopique: Dans les frottis du sang colorés au Leishmann, je trouve de rares spirochètes. Ils sont granuleux, à contours incertains, comme s'ils étaient en voie de lyse. Par-ci, par-là, il y'en a en amas, fortement granuleux (fig. 2). Un de ces amas est contenu, dans un leucocyte (fig. 2). Dans une hématie, je trouve un spirochète granuleux, présentant aux 2 extrémités et au centre trois boules colorées en violacé, analogues aux granulations, qu'on trouve parfois dans les hématies dans quelques cas de spirochétiose des poules (fig. 2). Dans les frottis des organes, sauf les testicules et le système nerveux central, je trouve aussi de rares spirochètes fortement granuleux. Dans les coupes traitées par la méthode de Volpino-Levaditi, je ne trouve que des formes fortement granuleuses, douteuses.

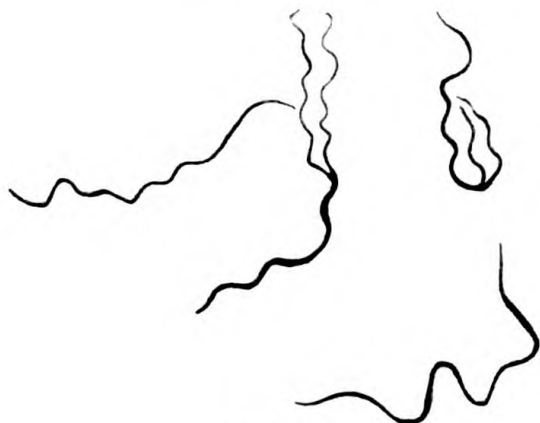


Fig. 1.



Fig. 2.

Des coagulums de sang provenant de ce coq, sont placés dans des éprouvettes avec de la solution citratée (Citrates de soude et chlorure de sodium à 0,50, eau distillée 100). Après 6 h. à l'étuve à 37°, l'examen microscopique ne permet plus de constater la présence de spirochètes dans le sang. Le Leishman ne colore plus en violacé que des corpuscules ovoïdes ou arrondis. Avec ce matériel j'inocule:

1) Une jeune poule No. 6, dont le sang ne présente point de spirochètes, dans les muscles pectoraux (2 c.c.). Temp. 41° 8. 20 II. La poule est triste, et se tient couchée sur la ventre. La crête est pâle. Examen du sang: Très nombreux spirochètes. 21 II. L'animal semble se remonter un peu. Examen du sang: Spirochètes toujours très nombreux. 22 II même état. Examen du sang: Innombrables spirochètes, dont plusieurs en voie de division longitudinale, plusieurs agglutinés en gros amas. 23 II. La poule est couchée sur le flanc. La crête est flasque, blanchâtre, cyanosée sur les bords. Yeux fermés. Respiration difficile. Temp. 42° C. Elle meurt au moment de la prise du sang. Examen du sang: Point de spirochètes libres. Par-ci, par-là des amas très gros, enchevêtrés, fortement granuleux, en complète lyse. Autopsie: Crête pâle à bords cyanosés. Muqueuses pâles. Fort amaigrissement. Un peu de congestion pulmonaire. Rate 1 fois et  $\frac{1}{2}$  d'une rate normale. Forte hyperémie cérébrale. Les frottis des organes ne montrent que de rares formes de spirochètes fort granuleux. Ce n'est que dans un ovule de l'ovaire que je trouve quelques spirochètes absolument bien conservés. Dans les coupes des organes au Volpino-Levaditi, il n'y a que quelques amas de granulations. Du sang citraté de cette poule, est inoculé dans les pectoraux d'un jeune pigeon sans résultat.

2) Une souris blanche No. 7 dans les muscles de la cuisse ( $\frac{1}{2}$  c.c.). Elle n'a rien présenté et l'examen du sang a été négatif.

1) Toutes les figures ont été dessinées à la chambre claire, tube 170 mm., oc. comp. 18, ob. imm. hom. 2 mm.

Le sang citraté du coq No. 5 (Exp. IV, 2<sup>e</sup> série) a été gardé à l'étuve à 37°, et des coagulums, dans une capsule en verre dans une armoire à circulation d'eau (+ 8°). Le 11 V. le sang gardé à l'étuve est inoculé à la dose d' $\frac{1}{2}$  c. c. dans les pectoraux d'un jeune poulet No. 8 et celui, gardé à + 8° et qui est en putrefaction est délayé dans de la solution physiologique et inoculé à la même dose au jeune poulet, No. 9. Le résultat a été complètement négatif. On sait que Dschukowsky et Luhs<sup>1)</sup> ont conservé virulent du sang citraté gardé à + 5° pendant 70 jours.

Si nous parcourons les expériences que je viens d'exposer, nous pouvons faire les remarques suivantes.

Tandis qu'avec *A. persicus* de Kairouan, il ne m'a pas été possible de déterminer la spirochétiose des poules, la chose a été possible avec *A. persicus* de Houmt-Souk (île de Djerba), chose qui démontre l'existence de cette maladie dans l'île de Djerba, où jusqu'à maintenant, elle n'avait pas été signalée.

Dans 2 cas (Exp. I 1<sup>re</sup> série, et Exp. II, 2<sup>e</sup> série) j'ai constaté, comme dans un cas cité dans mon premier mémoire, la présence de corpuscules ovoïdes ou arrondis dans les globules rouges, corpuscules correspondants à ceux observés par Balfour et par Bouet, et qui, suivant le premier, seraient la caractéristique des formes chroniques de la spirochétiose des poules. Suivant Balfour<sup>2)</sup> ses corpuscules ne seraient autre chose que des granulations mises en liberté par des spirochètes dans la rate et dans les poumons, granulations qui pénétreraient dans les hématies pour y accomplir un cycle schizogonique. Pour Balfour ces corpuscules correspondraient aux granulations trouvées par Leishman dans le corps d'*O. moubata* infecté avec *Sp. duttoni*<sup>3)</sup>. Comme dans un cas (Exp. IV, 2<sup>e</sup> série) j'ai trouvé dans un hématie un spirochète granuleux mettant en liberté des boules violacées (fig. 2), je me demande si la transformation signalée par Balfour dans la rate et dans les poumons, ne s'opère pas aussi parfois, après pénétration des spirochètes dans les globules rouges. Il est aussi intéressant de noter que le sang du coq No. 5 (Exp. IV, 2<sup>e</sup> série), gardé à 37° dans la solution citratée, ne présentait plus de spirochètes visibles mais uniquement des corpuscules colorés en violacé et nonobstant ça, son inoculation a donné à la poule No. 6 une spirochétiose typique. Il est à se demander si ces corpuscules correspondent à ceux que Dschukowsky et Luhs<sup>4)</sup> ont vu dériver de spirochètes ensemencés dans du plasma citraté d'oie, contenu dans des sacs de collodion et placés dans la cavité péritonéale du lapin.

Intéressantes à signaler sont les formes de spirochètes avec une extrémité bifurquée, formes observées dans le sang du coq No. 5 et de la poule No. 6 (Exp. IV, 2<sup>e</sup> série). Ces formes, comme j'ai indiqué, semblent bien être en voie de division longitudinale. Dans ces 2 cas j'ai aussi signalé la destruction extracellulaire des spirochètes par lyse. J'ai voulu voir si un phénomène analogue pouvait se vérifier chez des animaux à sang froid. Dans ce but du sang à spirochètes de la poule No. 6 (Exp. IV, 2<sup>e</sup> série), sang récolté et citraté le 21 II a été inoculé dans le sac dorsal d'un *Triton cristatus* et d'une *Rana esculenta* placés ensuite à 32°. Le 22 II. l'examen du contenu du sac dorsal, permet de constater la présence de spirochètes déjà profondément modifiés: Les ondulations sont beaucoup moins manifestes, comme relâchées, le

1) Travail cité.

2) Journal of tropic. Med. 1911. p. 113.

3) Bull. de l'Inst. Pasteur. 1909. p. 520.

4) Travail cité.

corps des spirochètes est très granuleux. Tous les exemplaires sont extracellulaires (fig. 3). Dans le sang il n'y en a point. Le 23 on ne trouve plus de formes visibles de spirochètes. Le 25 la grenouille succombe et on ne trouve de spirochètes ni dans le sang ni dans les organes, ni dans le sac dorsal.

Intéressant au point de vue de la transmission héréditaire des spirochétioses, est le fait que j'ai constaté chez la poule No. 6 (Exp. IV, 2<sup>e</sup> série) de la présence de spirochètes bien conservés dans une ovule de l'ovaire.

La coloration et la recherche des spirochètes a surtout bien réussi par le procédé de Leishman. La coloration a été plus pâle par le bleu au thymol, et moins bonne par la thionine phéniquée. La méthode à l'encre de chine de Burri, m'a donné de bons résultats, si appliquée à du sang citraté (1 gtte. du sang citraté + 1 gtte. encre de chine diluée 1 : 3); très mauvais appliquée directement au sang (beaucoup de précipité). Ces différentes méthodes et le Volpino-Levaditi, je les ai appliquées à des Argas triturés dans de la solution physiologique, mais je n'y ai rien trouvé de caractéristique, sauf des granulations suspectes colorées en violacé par le Leishman, qui pourraient correspondre à celles vues aussi chez *O. moubata* infecté avec *Sp. duttoni* par Leishman et et *A. persicus* par Balfour<sup>1)</sup>.



Fig. 3.

Au courant de ces recherches, j'ai fait quelques observations sur la biologie d'*A. persicus*, que j'ai gardé, comme dans mes expériences précédentes, dans des bocaux remplis à  $\frac{3}{4}$  de terre et couverts avec une gaze, à une température de 30°—32°. Mr Weiss m'ayant signalée le fait que à l'île de Djerba, *A. persicus* s'abrite volontier dans des coquilles d'escargot, j'ai mis de ces coquilles dans un bocal et j'ai en effet constaté comme les Argas s'y tenaient cachés très volontiers, se cachant du reste d'une façon analogue dans des trous que j'avais percé dans un bouchon. Les Argas sortis de ces bocaux, se fixaient en général immédiatement sur les poules, quand ils désiraient piquer, mais parfois quelques uns qu'on sortait, avaient l'air d'être morts. Il suffisait de les placer sur une platine en cuivre chauffée à 50° pour les réveiller et les rendre immédiatement aptes à piquer. La durée de fixation a varié de 7' à 1 h.  $\frac{1}{2}$ , les jeunes restant généralement fixés plus longtemps que les adultes. Quelques uns restaient longtemps fixés sans arriver à absorber du sang. Les intervalles entre les piqûres ont varié aussi dans ces expériences, entre quelques jours, un mois et jusqu'à 5 mois. Un exemplaire que j'ai gardé au laboratoire du 7 V 1908 au 20 V 1910 ayant piqué le 18 II 1909 a refusé de piquer le 30 IV 1909, le 29 V 1909, le 13 VII 1909 et le 8 X 1909. Il n'a piqué que le 23 XI 1909 restant fixé  $\frac{3}{4}$  d'h. et absorbant 4 cg. de sang. Cet exemplaire, tout en provenant d'un lot d'Argas de Dratamar qui m'avaient

1) Journal of trop. Med. 1909. p. 285.

servi à déterminer la spirochétiase des poules à Lausanne, n'a jamais déterminé l'infection.

Tout en se nourrissant du sang des oiseaux, *A. persicus* se fixe aussi sur l'homme et les autres mammifères, mais il a certainement des prédilections. Déjà parmi les oiseaux, il n'aime pas tant se fixer sur le pigeon, et c'est peut être à cause de ça que chez cet animal *Sp. anserina* ne s'est pas adapté. Devant choisir entre oiseaux et mammifères, il se porte sur les premiers plutôt que sur les seconds. Ainsi, un exemplaire qui avait refusé de me piquer a piqué immédiatement après un coq.

N'ayant trouvé aucune indication sur la possibilité de faire piquer par *A. persicus* adulte, des animaux à sang froid, j'ai porté le 8 II. 1911 sur un *Bufo vulgaris*, 10 exemplaires dont un à jeun depuis le 23 V. 1910, 2 depuis le 6 VI. 1910, et depuis le 20 VII. 1910, 2 depuis le 7 X. 1910, et un depuis le 21 X. 1910. Tous ont refusé de piquer. J'ai alors essayé de chauffer la surface de la peau du crapaud en y passant un tampon de coton trempé dans de l'eau très chaude. Les 2 à jeun depuis le 7 X. 1910 se sont immédiatement fixés. L'un s'est détaché après 22' sans avoir réussi à sucer du sang, l'autre est resté fixé toute la journée. Quand je l'ai détaché, il était mort et n'avait pas pu réussir à absorber du sang. Mon expérience démontre que *A. persicus* à l'état adulte, n'a aucune tendance à se fixer sur les animaux à sang froid. Il ne le fait parfois que si l'on chauffe la surface cutanée de ces animaux. C'est probablement la forte épaisseur de la peau de *Bufo vulgaris* qui a empêché les 2 exemplaires fixés d'arriver à sucer du sang. Quant à la raison de la mort d'un des exemplaires qui s'étaient fixés, il faut peut être la chercher dans la sécrétion toxique des glandes cutanées du crapaud. On sait du reste que Dönitz a vu mourir des larves d'*A. persicus* fixés sur des souris blanches, et Lounsboury un adulte qui avait sucé sur son bras<sup>1)</sup>.

Je crois intéressant signaler le fait que suivant Mr. Weiss à l'île de Djerba *A. persicus* pourrait s'établir en véritable parasite sur des Hélicidés en détruisant à la longue son hôte et les jeunes pourraient y accomplir leur évolution. La chose a besoin d'être confirmée.

Le 22 IV. 1910 je trouve dans un bocal contenant *A. persicus* de Kairouan reçus le 2 IV., un amas d'œufs<sup>2)</sup>. Ils éclosent le 25 IV, les jeunes larves restent en tas sans se déplacer, même si touchées, jusqu'au 27 IV. jour où elles se répandent dans tout le bocal. Le 30 IV, je porte ces larves sur un jeune moineau (*Passer domesticus*) pris à Lausanne, moineau chez lequel l'examen microscopique du sang n'a rien démontré. Il est gardé dans une boîte vitrée à 22°—24°. L'animal continue à bien se porter, mais vers le 15 V. il devient triste, le 20 il est fortement amaigri et il ne mange presque plus. Il meurt le matin du 23. Autopsie: Fort amaigrissement. Tuméfaction de la rate. Ni dans les frottis du sang et des organes colorés au Leishman, ni dans les coupes des organes je trouve des spiro-



Fig. 4.

1) Dönitz, Die wirtschaftlich wichtigen Zecken. Leipzig 1907. p. 28.

2) Les œufs d'*A. persicus* ont un diamètre de mm. 0,5—0,6 et non de mm. 5—6 comme par erreur il a été imprimé dans mon premier mémoire, p. 201.

chètes, mais dans les frottis du sang, je trouve dans un grand nombre de globules rouges des hémospories du type *Halteridium danilewskyi*, disposés en haltère à côté du noyau. Ils présentent une masse allongée de chromatine vers la partie centrale et disséminés dans le protoplasma quelques grains de pigment brun-jaunâtre (fig. 4).

Faut-il penser à une inoculation de ces hémospories par les larves d'*A. persicus*? Je ne le pense pas, mais je crois que l'affaiblissement produit chez le moineau par les piqûres des larves a réveillé une attaque de malaria, mettant en circulation des hémospories qui se tenaient dans la rate et dans la moëlle des os. Ça expliquerait pourquoi je n'en avais pas trouvé dans le sang de ce moineau, examiné avant les piqûres, des larves d'*Argas*. Je note en passant que c'est la première fois qu'on signale des hémospories du type *Halteridium* chez des oiseaux de la Suisse.

Ayant trouvé dans un bocal une nouvelle ponte d'environ 200 larves d'*A. persicus*, je les ai portées sur une souris blanche gardée dans un bocal à 22°—24°, le 10 XI. 1910. Toutes ces larves se sont fixées sur la souris et gorgées de sang, mais elles sont toutes mortes, confirmant ainsi l'observation de Dönitz que j'ai citée. Quant à la souris le 23 XI elle présentait pâleur extrême des oreilles et des muqueuses, tout en étant dans un bon état de nutrition. L'examen du sang a montré un peu de leucocytose, mais point de spirochètes.

Au point de vue de la protection des poules contre les piqûres d'*A. persicus*, dans mon premier mémoire (p. 202), j'avais proposé de placer les cages dans des plateaux contenant une couche d'huile de vaseline ou d'une autre huile. Or, suivant Simond, Aubert et Noc<sup>1)</sup> c'est justement un procédé analogue qu'on emploie à la Martinique: On éloigne les perchoirs des murs et on les dispose sur des supports fichés dans le sol et munis à mi-hauteur de godets circulaires contenant de l'eau pétrolisée, qui empêche les *Argas* d'arriver jusqu'aux poules.

### Résumé.

1° Avec *A. persicus* de Kairouan j'ai déterminé à Lausanne la forme chronique et avec ceux de Houmt-Souk (île de Djerba) la forme aiguë de la spirochétiose des poules.

2° La spirochétiose des oiseaux de basse-cour est une affection unique déterminée partout par un seul spirochète: *Sp. anserina* Sacharoff, qui peut pénétrer dans les hématies où l'on le rencontre, sous forme de corpuscules arrondis ou ovoïdes surtout quand la maladie évolue d'une façon chronique.

3° L'étude de la biologie d'*A. persicus*, nous démontre, entre autres, que ce parasite a une prédilection surtout pour le sang des oiseaux, mais qu'il peut se fixer même sur des animaux à sang froid si on chauffe la surface cutanée de ces animaux.

Lausanne, 17 juin 1911.

1) Bull. de l'Inst. Pasteur. 1909. p. 519.



*Nachdruck verboten.*

## Etude biologique et histologique sur les trypanosomes chez les bovidés de Grèce.

Par les docteurs

**Jean P. Cardamatis,**  
Professeur agrégé des maladies des  
pays chauds

et

**Socrate Photinos,**  
Chef de laboratoire d'anatomie patho-  
logique.

Avec 1 planche.

A la découverte faite il y a une dizaine d'années par A. Theiler<sup>1)</sup> d'un trypanosome pathogène chez les bovidés du Transvaal et qu'on croyait au début être la cause de la maladie Galziette, ont succédé les travaux suivants pour la découverte du même trypanosome:

Miyazima<sup>2)</sup>, 1897; Martini<sup>3)</sup>, 1909 aux îles Philippines; Crawley<sup>4)</sup>, 1909 en Amérique; Knuth, Rauchabaar et Morgenstern<sup>5)</sup>, 1910 en Allemagne; Edmond et Etienne Sargent<sup>6)</sup>, 1911 en Algérie; P. Delanoë<sup>7)</sup>, 1911 en France; A. Carini<sup>8)</sup>, 1911 au Brésil et Yakimoff<sup>9)</sup>, 1911 à Tunis.

Nous avons répété avec succès leurs travaux dans le but de nous assurer de l'existence des trypanosomes chez nos bovidés. Nous avons commencé nos recherches au mois de Mai dernier et nous avons pris la matière parmi les bœufs tués aux abattoirs d'Athènes; les animaux provenaient de Thessalie, de la Grèce continentale, du Péloponnèse, des îles de la mer Egée et de Crète.

Nous avons pris le sang des bœufs tués à deux dates: Les uns le 13 Mai, soit deux bœufs provenant de l'île de Céos, une vache de 3 ans et un bœuf d'un an et demi et le 15 du même mois, soit treize bêtes, mâles et femelles, de 2 à 5 ans et provenant de différents endroits de la Grèce.

En outre du sang recueilli des bêtes susdites pour la culture des trypanosomes nous avons pris encore le sang de circulation et celui des viscères; nous en avons fait des préparations sèches pour y constater au microscope l'existence des trypanosomes et des piroplasmes. Nous n'avons pas trouvé de trypanosomes, mais nous avons trouvé des pyroplasmes dans le sang de 2 bêtes sur 15 (soit une proportion de 13,33 %) bêtes de 1½ an à 5 ans provenant de l'île de Céos.

Comme nous avons pris le sang à deux dates différentes et que nous avons opéré de différente manière dans les ballons à perles, nous divisons nos travaux expérimentaux en trois séries, savoir:

Dans la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> série d'expériences, nous avons employé pour la prise du sang un ballon à perles pour chacune des dix bêtes, dans la 3<sup>ème</sup>, nous avons employé un seul ballon à perles pour recueillir le sang de cinq bêtes, en agissant comme suit:

1) Theiler, A., A new Trypanosoma. (Journ. of compar. Pathol. a. Therap. T. 16. 1903.)

2) Philippine, Journ. of Sc. T. 2. No. 2; Med. Sc. 1907. Mai.

3) Philippine, Journ. of Sc. T. 4; Med. Sc. 1909. Juin.

4) Bur. of anim. Industry. Bull. 22. 1909. Octobre.

5) Berlin. tierärztl. Wochenschr. 1910. Juli u. Aug.

6)–9) Bull. Soc. de pathol. exot. T. 4. No. 1, 2, 4, 5. 1911.

Dans des ballons à perles stérilisés pour défibriner le sang nous avons recueilli une partie du sang au moment où il jaillissait des vaisseaux sanguins de la bête abattue, car recueilli ainsi il est aseptique. Une fois défibriné nous l'avons distribué, deux heures après sa prise, dans des tubes (à raison de trois tubes par bête) de bouillon nutritif ordinaire dans la proportion de 3 c. c. de sang pour 10 c. c. de bouillon et nous l'avons conservé dans le laboratoire à la température de 20° C.

La première série de nos expériences ne concerna que deux bêtes seulement et la culture des trypanosomes se développa dans les trois tubesensemencés du sang de la deuxième bête (proportion de réussite 50 %).

La deuxième série concerna huit bêtes et la culture des trypanosomes se développa dans tous les tubesensemencés du sang de cinq bœuf (proportion de réussite 62,5 %).

La troisième série concerna cinq bêtes, dont une partie du sang, recueilli dans un ballon à perles commun etensemencé dans dix tubes, ne donna pas de culture de trypanosomes; cela, probablement, à cause du développement d'autres colonies de microbes qui, malgré toutes les précautions, ont infecté le ballon pendant la prise du sang des différentes bêtes.

La culture dans les tubes ainsi préservés commença à paraître déjà à partir du deuxième jour, à la surface du culot sanguin et sous la forme de points blancs, avec diversité de formes, de dimensions et de nombres de colonies. Dans l'un des tubes où la culture s'est développée très abondamment, les colonies avaient formé à la surface du culot sanguin une espèce de couronne blanche qui s'est conservée sous cette forme pendant plusieurs jours, quoique nous en ayons pris à plusieurs reprises avec la pipette une partie de la colonie pour l'examiner au microscope.

Cependant, comme il ressort de nos recherches, tous ces points blanchâtres n'étaient pas des colonies de trypanosomes, mais quelques-uns étaient des amas de leucocytes et de fibrine parmi lesquels se trouvaient des trypanosomes en petit nombre.

Nous avons trouvé encore des trypanosomes également à la hauteur des points blancs, de ceux qui se composent d'hématies blanches ainsi que dans les intervalles.

Dans tous les tubes où la culture des trypanosomes avait été obtenue, le bouillon était très transparent et les colonies reprises par la pipette se détachaient facilement de la surface du sang.

Les cultures étaient luxuriantes du 6<sup>e</sup> au 12<sup>e</sup> et 15<sup>e</sup> jour après la semence; au delà commençait la dégénérescence. Cependant les trypanosomes se conservaient vivants, mais naturellement avec des mouvements très lents, et cela jusqu'au 25<sup>e</sup> jour après la semence.

Dans deux tubes infectés par d'autres microorganismes pendant la semence, nous ne trouvâmes aucun trypanosome.

\* \* \*

En examinant les cultures au microscope nous observons que les trypanosomes se présentent comme des corpuscules sphériques, ovales, fusiformes, oblongs et souvent sous la forme de spermatozoaires. Ils sont très réfringents, de dimensions variées et se mouvent rapidement en avant, ils ont des flagelles ou n'en ont point.

Les plus petits de ces corpuscules ont comme volume la moitié de celui des hématies rouges physiologiques: Les plus grands ont de 60 à 70  $\mu$  de longueur, cependant on en rencontre quelques-uns qui ont 80  $\mu$  de longueur et 6  $\mu$  de largeur y compris la flagelle.

Dans la plupart des cas les trypanosomes étaient accumulés et formaient des groupes de cinq, de dix et de plus encore, jamais sous la forme de rosaces. Quelquefois leur nombre est tel que dans plusieurs champs visuels ils recouvrent tout le champ et sont tellement entrelacés qu'il est impossible d'en détacher un seul.

Dans ce cas, pour faciliter l'examen au microscope nous versons sur la lame porte-objet et sur cette masse blanche des trypanosomes, visible à l'œil nu, quelques gouttes du bouillon du tube ou de sérum physiologique, nous mêlons bien au moyen d'un fil de platine et nous séparons les trypanosomes accumulés.

Dans les cultures de 8 à 10 jours, les formes dominantes sont la sphérique et l'ovale.

Dans les jeunes formes nous en distinguons avec flagelle et sans flagelle.

**Jeunes formes sans flagelle.** Au début le trypanosome de cette forme est sphérique, il occupe la moitié du volume de l'hématie rouge physiologique; il a le protoplasme et le noyau compact; celui-ci est situé vers la périphérie du corpuscule, en couvre le tiers, est oval et a près de lui le centrosome (Fig. 1). Peu à peu sort du protoplasme un prolongement protoplasmique qui croît lentement (Fig. 2); le noyau se porte de la périphérie vers le milieu où il rencontre le centrosome. Le corpuscule s'allonge ainsi et devient piriforme (Fig. 7). Le trypanosome après avoir encore crû commence à se multiplier par division longitudinale et binaire et cette division commence par le centrosome (Fig. 8—10).

**Jeunes formes avec flagelle.** La forme primitive de celles-ci est sphérique comme dans les précédentes; le trypanosome a un volume égal à la moitié de l'hématie rouge physiologique (Fig. 1') avec un protoplasme granulé; vers le centre de ce corpuscule est à peine visible la chromatine du noyau. Le centrosome compact se trouve exactement à la périphérie et il sort de ce centrosome une flagelle très mobile qui atteint quelquefois cinq fois la longueur du corpuscule.

Entre temps le noyau compact et presque oval du trypanosome qui a crû, se porte à l'extrémité arrière du trypanosome, occupe le tiers du corpuscule et s'attache étroitement au centrosome; alors le trypanosome devient piriforme (Fig. 2'). Quelquefois le noyau se porte non à l'extrémité arrière, mais vers le centre du corpuscule et le centrosome au lieu de s'y attacher reste loin du noyau.

Lorsque le trypanosome a crû de plus en plus, alors commence sa division longitudinale et binaire par la division du centrosome et ainsi de suite (Fig. 5'—7').

En outre de la forme sphérique avec ou sans flagelle, dont nous avons parlé plus haut, nous avons encore observé dans les cultures des trypanosomes la forme oblongue.

Le volume du trypanosome de cette forme est au début la moitié de celui de l'hématie rouge physiologique; le trypanosome est oblong avec un noyau et un centrosome compact (Fig. a). Le protoplasme s'allonge peu à peu de chaque côté (Fig. b). De cette manière ce corpuscule s'allonge peu à peu et l'une de ses extrémités devient obtuse (Fig. c, d).

et l'autre pointue; celle-ci se termine par une flagelle (Fig. e). A la croissance du trypanosome succède la division longitudinale et binaire qui s'effectue comme d'habitude.

Dans quelques-uns de ces trypanosomes, dans des préparations fraîches, nous avons observé qu'en outre de la flagelle se développe un prolongement protoplasmique, d'habitude un, plus rarement plusieurs, et se mouvant (Fig. G) avec la même agilité que la flagelle.

Dans les cultures de 15 jours nous avons observé que:

Un grand nombre des jeunes ainsi que des grandes formes de trypanosomes portaient beaucoup de granulations chromatoïdes compactes du noyau, colorées en violet foncé; mais le protoplasme de ces trypanosomes près de ces granulations était coloré en bleu foncé (Fig. A, B, C).

Dans beaucoup de trypanosomes de 14 jours nous observons habituellement autour du parasite une sécrétion muqueuse qui enveloppe soit tout le trypanosome (Fig. C) soit une partie de ce dernier (Fig. A, B) et elle porte des points, dont quelques-uns sont colorés en rouge clair et d'autres en violet foncé.

La plupart des trypanosomes des cultures mures ont la forme rubannée (Fig. I); chez d'autres, ayant l'extrémité arrière sphérique et étant de la dimension d'une hématie rouge physiologique, s'allonge d'un point de leur sphère une matière protoplasmique en forme de queue (Fig. E.)

Dans tous les trypanosomes le centrosome se trouve en contact avec le noyau, qui se trouve pour la plupart au milieu du corps du trypanosome. Font exception à cette règle quelques trypanosomes fins et oblongs, d'une longueur triple de l'hématie rouge physiologique avec un noyau distinct et oval, dans lesquels le centrosome se trouve loin du noyau (Fig. D).

Néanmoins dans beaucoup de parasites de 14 jours nous avons trouvé le centrosome situé sur le noyau et vers sa périphérie. De même dans la plupart des trypanosomes, la membrane ondulente manque ou n'est que peu développée et la flagelle tantôt se limite à entourer le bord de la membrane, quand il y en a, ou la dépasse aussi quelquefois, tantôt s'étend librement sans qu'il y ait trace de membrane ondulente.

Dans les cultures de 17 jours la plus grande partie des trypanosomes sont grands, quelques-uns ont une longueur décuple des hématies rouges physiologiques (Fig. F).

Dans les cultures de 25 jours les mouvements des trypanosomes sont très faibles ou même n'existent plus et tous les trypanosomes sont assez dégénérés.

\* \* \*

Pour colorer les trypanosomes nous avons employé au début la liqueur de Giemsa, mais nous l'avons bientôt abandonnée parce que, comme on le sait, par cette liqueur le noyau des trypanosomes pendant leurs jeunes formes des cultures ne sont pas colorés; nous avons donc en recours à la méthode de Pézopoulos-Cardamatis<sup>1)</sup> modifiée maintenant par nous et qui colore admirablement les jeunes formes des cultures.

Au lieu de prendre 10 gr. de solution d'éosine nous en prenons 12 gr., puis nous répandons au moyen de la pipette le liquide, après le mélange

1) Die Malaria in Athen . . . . (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 40. p. 344—350, 480—495.)

des trois solutions et par gouttes, sur la préparation sèche en ayant soin de pomper au moyen de cette pipette le liquide du fond du flacon pour éviter le précipité de la surface. Nous répandons le liquide jusqu'à ce que le champ de la préparation en soit complètement recouvert. Un quart d'heure après, sans renverser le liquide qui est sur la lame porte-objet, nous portons l'extrémité de cette lame au dessous de la fontaine qui coule un petit filet d'eau. L'eau en tombant sur l'extrémité de la lame porte-objet emporte la matière colorante à l'extrémité opposée et ainsi se trouve nettoyée la lame sans qu'il y ait trace de précipité.

Dans le cas où par suite d'une faute ou d'un hasard nous laissons couler la solution recouvrant la lame, et que se colle sur la surface des préparations la surface du liquide qui est pleine de précipité, alors nous nous débarrassons du précipité en employant une solution d'alcool et d'eau à dose égale et nous y agitions pendant quelques secondes la lame porte-objet.

#### Explication de la planche.

- Fig. 1—7: Formes jeunes sans flagelle.  
 Fig. 8—10: Début de leur multiplication.  
 Fig. 1'—4': Formes jeunes avec flagelle.  
 Fig. 5'—7': Début de leur multiplication.  
 Fig. a—g: Formes oblongues.  
 Fig. I—XII: Formes de la division longitudinale.  
 Fig. A, B, C, E, F, I, K, XI, XII: Formes avec granulations chromatoides.

*Nachdruck verboten.*

## Zur Frage der Doppelkernigkeit mancher Hämogregarinen.

[Aus dem Pasteurschen Institut in Sao Paulo, Brasilien.]

Von Dr. A. Carini.

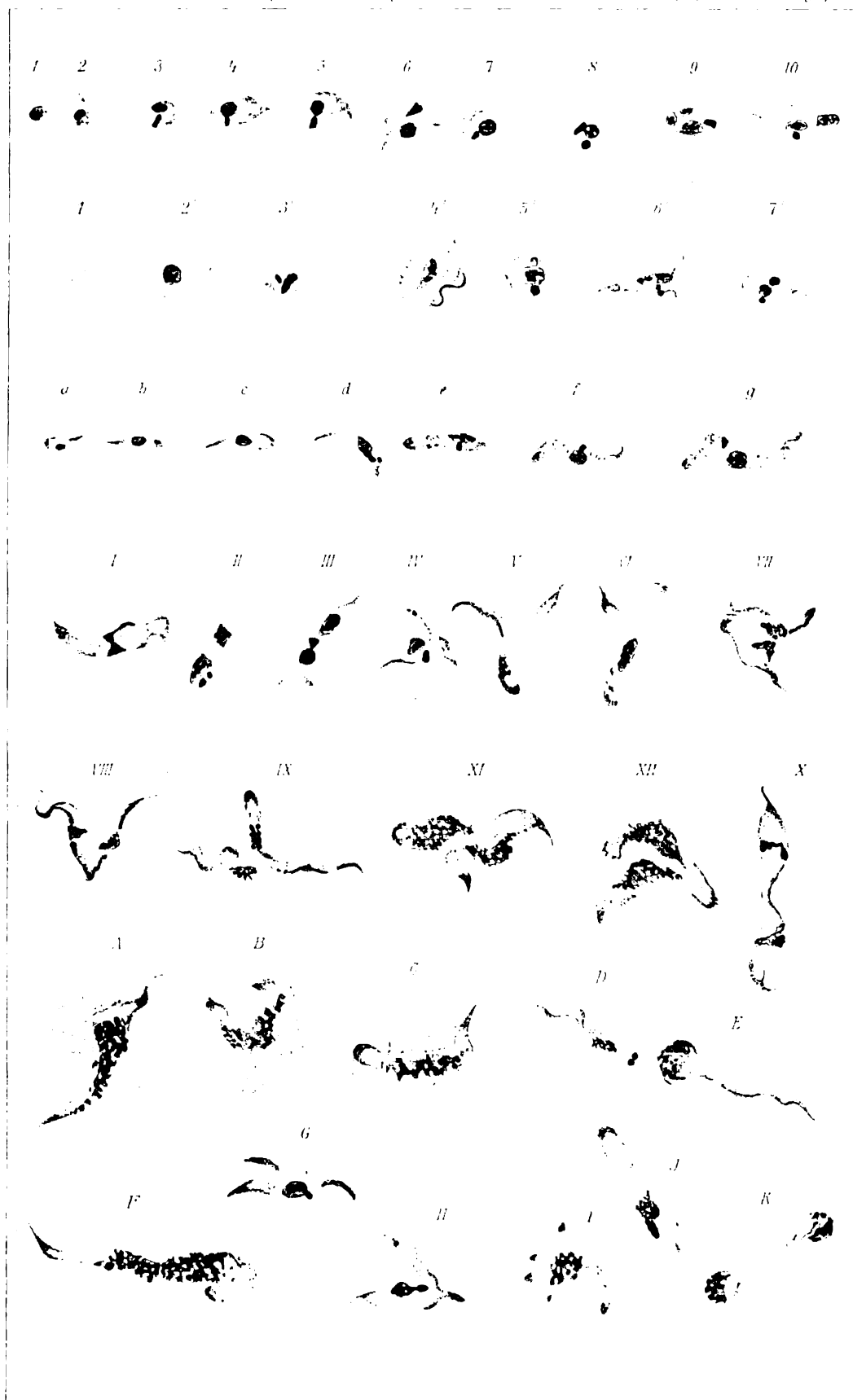
Mit 5 Figuren.

Durch die Beobachtungen von Prowazek, França, Neumann, Seitz u. a. ist bewiesen worden, daß manche Hämogregarinen außer dem Hauptkern noch einen zweiten Kern (Blepharoplast oder Kinetonucleus) besitzen, und dadurch ist es Hartmann und Jollos möglich gewesen, einen Teil der Hämogregarinen in die Ordnung der Binucleata, die fast alle bekannte Blutprotozoen einschließt, einzureihen.

Aber die Zahl der Hämogregarinen, in denen die Anwesenheit eines Blepharoplasten sicher bewiesen ist, ist noch sehr gering, und es scheint, daß die Mehrzahl der bis jetzt bekannten Hämogregarinen, besonders der von den Säugetieren herkommenden, nicht zu den Binucleaten gehört.

Da ich letzthin eine große südamerikanische Eidechse (*Tupinambis teguixin* L.) hatte, deren Blut zahlreiche Hämogregarinen (*Haemogregarina tupinambis* Laveran u. Salimbeni) aufwies, benutzte ich die Gelegenheit, um an diesen besonders großen Hämogregarinen die feine Struktur des Kernapparates eingehend zu studieren.

Die Präparate wurden naß fixiert in Sublimatalkohol und mit Eisenhämatoxylin gefärbt. In den besser gefärbten Blut- und Organausstrichen fanden sich zahlreiche Hämogregarinen, die neben dem Hauptkern eine andere kleine Chromatinmasse aufwiesen (Fig. 3). Dieses chromatische



Gezeichnet von Gustav Fischer, Jena.

Gezeichnet von Johannes Arndt, Jena.





Körperchen von  $1\frac{1}{2}$ – $2\ \mu$  ist oval oder rundlich, und scheint manchmal von einer sehr schmalen, hellen Zone (Kernsaftzone) umgeben zu sein.

In den trocken fixierten und mit Giemsa oder Leishman gefärbten Blutaussstrichen ist es nicht möglich, dieses Chromatinkörperchen zu sehen (Fig. 2).

Wir glauben kaum, daß man diese Chromatinmasse anders deuten kann, als einen echten Blepharoplasten, obwohl jede Spur von lokomotorischem Apparat (undulierte Membran, Rhizoplast, Geißel) fehlt.

Es wäre natürlich sehr interessant gewesen, zu sehen, wie sich diese Chromatinmasse bei den Vermehrungsvorgängen verhält, aber ich habe bis jetzt keine Teilungsformen finden können.

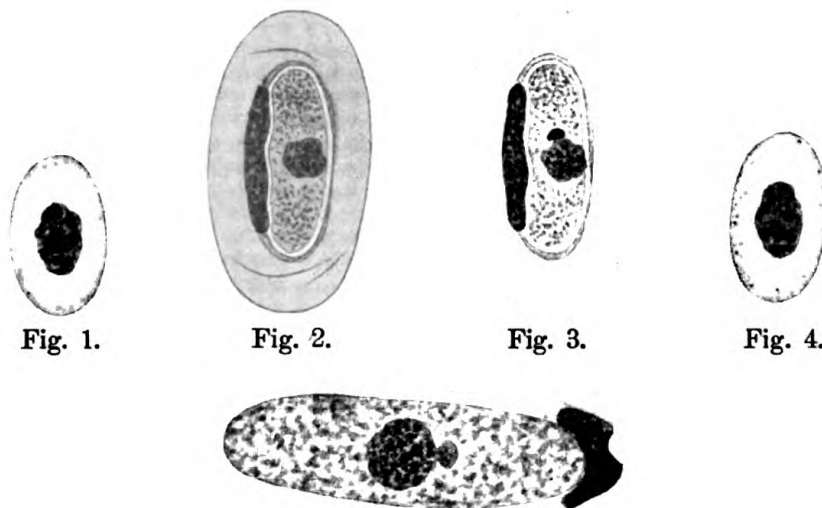


Fig. 1.

Fig. 2.

Fig. 3.

Fig. 4.

Fig. 5.

Fig. 1. Normaler Erythrocyt von *Tupinambis teguixin*.

Fig. 2. *Haemogregarina tupinambis* innerhalb eines stark hypertrophierten Erythrocyten. Trockenfixierung und Giemsa-Färbung.

Fig. 3. Derselbe nach Naßfixierung und Eisenhämatoxylinfärbung.

Fig. 4. Normaler Erythrocyt von *Leptodactylus ocellatus*.

Fig. 5. Große Hämogregarine (*Leucocytozoon*?) mit deutlichem Blepharoplasten.

Die oben beschriebene Beobachtung hat mich überzeugt, daß das Blutprotozoon, das ich im Blute von *Leptodactylus ocellatus* als *Leucocytozoon* beschrieben habe, kein echtes *Leucocytozoon* ist, sondern eine Hämogregarine.

Auch dieses Protozoon zeigte in den trocken fixierten und nach Giemsa gefärbten Präparaten oft sehr deutlich neben dem Hauptkern einen Blepharoplasten (Fig. 5).

Da es zu der Zeit, als ich dieses Protozoon beschrieb, noch nicht bekannt war, daß manche Hämogregarinen einen Blepharoplasten besitzen können, so habe ich meinen Parasiten infolge seines Doppelkernes als *Leucocytozoon* klassifiziert, besonders da er sich innerhalb der Leukocyten vorfand. Heute würde ich diese Klassifikation nicht mehr aufrecht erhalten, da auch echte Hämogregarinen einen Doppelkern besitzen und endoleukocytär sein können.

Diese Beobachtungen zeigen noch zwei Hämogregarinen, eine von Reptilien, die andere von Batrachiern herkommend, bei denen die Anwesenheit eines Blepharoplasten bewiesen ist.

**Literaturverzeichnis.**

- França**, Quelques notes sur l'*Haemogregarina splendens* (Labbé). (Arch. do Inst. bact. Camara Pestana. 1908.)  
**Neumann**, Studien über protozoische Parasiten im Blute von Meeresfischen. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 64. 1909.)  
**Seitz**, Zur Frage der Hartmannschen Binucleaten. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 56. 1910.)  
**Hartmann u. Jollos**, Die Flagellatenordnung Binucleata. (Arch. f. Protistenk. Bd. 19. 1910.)  
**Laveran u. Salimbeni**, Sur une hémogrégarine du *Tupinambis teguixin* L. (Compt. Rend. Acad. Scienc. T. 148. 1909.)  
**Carini**, Un leucocitoozo del *Leptodactylus ocellatus*. (Rev. da Soc. scient. de S. Paulo. 1907.)

---

*Die Redaktion des „Centralblatts für Bakteriologie und Parasitenkunde“ richtet an die Herren Mitarbeiter die ergebene Bitte, etwaige Wünsche um Lieferung von besonderen Abdrücken ihrer Aufsätze entweder bei der Einsendung der Abhandlungen an die Redaktion auf das Manuskript schreiben zu wollen oder spätestens nach Empfang der ersten Korrekturabzüge direkt an den Verleger, Herrn Gustav Fischer in Jena, gelangen zu lassen.*

---

**Inhalt.**

- |  |   |
|--|---|
| <p><b>Abramow, S.</b>, Zur Frage über die Streptothrichosen des Zentralnervensystems, p. 481.<br/> <b>Cardamatis, Jean P. et Photinos, Sostrate</b>, Etude biologique et histologique sur les trypanosomes chez les bovidés de Grèce, p. 538.<br/> <b>Carini, A.</b>, Zur Frage der Doppelkernigkeit mancher Hämogregarinen, p. 542.<br/> <b>Fermi, Claudio</b>, Wirkung der Fette auf das Tollwutvirus, p. 494.<br/> <b>Galli-Valerio, E.</b>, Recherches sur la spirochétiase des poules de Tunisie et sur son agent de transmission: <i>Argas persicus</i> Fischer, p. 529.</p> | <p><b>Horn, A. u. Huber, E.</b>, Ein Beitrag zur Bakterienflora des Darmes gesunder, erwachsener Rinder, mit besonderer Berücksichtigung der Paratyphus-B-ähnlichen Bakterien, p. 452.<br/> <b>Northrup, Zae</b>, The influence of the products of lactic organisms upon <i>Bacillus typhosus</i>, p. 417.<br/> <b>Osaki, Y.</b>, Ein Beitrag zur Aetiologie des fötiden Eiters, p. 442.<br/> <b>Tedeschi, Aldo u. Napolitani, Melchiorre</b>, Experimentelle Untersuchungen über die Aetiologie des Sommerfiebers, p. 502.</p> |
|--|---|

# Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 61. Heft 7.

Ausgegeben am 6. Januar 1912.

*Nachdruck verboten*

## Ueber einen Fall von Pestübertragung durch *Putorius foetidus*.

[Aus der bakteriologischen Station in Odessa.]

Von Dr. Th. Skschivan und Dr. S. Stschastny.

Mit 1 Figur.

Am 17. Febr. 1911 wurde in die Pestbaracke des Städtischen Krankenhauses zu Odessa Herr S. K., Portier eines am äußersten Rande der Stadt befindlichen Landhauses, mit stark ausgeprägten klinischen Symptomen von Bubonenpest eingeliefert.

Die Untersuchung ergab bei dem Patienten S. K. einen harten, pflaumengroßen Bubo in der rechten Achselhöhle. Die Haut oberhalb des Bubo war rot, ödematös, etwas schmerzhaft. Auf dem Zeigefinger der rechten Hand befand sich eine lineare Inzision von 1—1.5 cm Länge. Temperatur 39°, Puls 120 in der Minute. Sensorium etwas getrübt; des Nachts Delirium. Sprache unklar. Die Zunge stottert gleichsam. Der Patient bekam subkutan Pestserum (aus dem Pestlaboratorium am Fort Kaiser Alexander I. in Kronstadt), und zwar am 17. Febr. 20,0 ccm, am 18. Febr. 120 ccm und am 19. Febr. 150 ccm.

Am 21. Febr. sank die Temperatur bis zur Norm, und gleichzeitig trat eine hochgradige Besserung des Allgemeinzustandes ein. Am 24. Febr. begann der Bubo sich zu resorbieren. Am 6. März wurde der Patient als gesund entlassen.

In dem am 17. Febr. gewonnenen Bubosaft ergab die mikroskopische Untersuchung spärliche, sich bipolar färbende Stäbchen. Aussaat des Saftes auf Agar gab nach 24 Stunden bei 30° im Kondensationswasser charakteristische Kettchen aus sich bipolar färbenden Stäbchen, nach 48 Stunden konnte man Pestbacillen in Reinkultur in Form von zarten Tropfen wahrnehmen, welche durch spezifisches Serum (aus dem Laboratorium am Fort Alexander I. in Kronstadt) in einer Verdünnung von 1:1000 und 1:2000 agglutinierten (Titre des Serums 1:3000).

Der letzte Pestfall wurde in Odessa fast vor 2 Monaten (am 24. Dez. 1910) beobachtet. In dem Orte, wo der Patient wohnte, waren weder unter den Menschen, noch unter den Ratten bis jetzt Fälle von Pest vorgekommen. Infolgedessen konnte man es sich kaum erklären, wo sich der Patient S. K. die Pestinfektion zugezogen haben mochte. Als man aber den Patienten selbst und die Personen seiner Umgebung (den Verwalter des Landhauses) näher befragte, stellte es sich heraus, daß der Patient S. K. einige Tage vor der Erkrankung (ungefähr am 11. oder 12. Febr.) den Hunden ein von denselben soeben erwürgtes Tierchen, augenscheinlich einen Iltis, entrissen und abgehäutet hatte. Hierbei verletzte er sich mit dem Messer, mit dem er die Häutung vornahm, am Zeigefinger der rechten Hand, ohne jedoch der geringfügigen Verletzung besondere Beachtung zu schenken. Nach einigen Tagen fühlte er sich schlecht und begab sich nach dem Städtischen Krankenhause, wo er als pestverdächtig befunden wurde. In dem Zimmer, welches der Patient inne hatte, fand man in der Tat ein halb vertrocknetes Iltisfell und lieferte dasselbe am 19. Febr. der Bakteriologischen Station zu Odessa behufs bakteriologischer Untersuchung ein. Was die Leiche des Iltis betrifft, so sagte der Kranke, daß er dieselbe im Hofe des Land-

hauses im Mist verscharrt habe, sich aber der Stelle nicht mehr erinnern könne.

Am 20. Febr. wurde nach der Bakteriologischen Station auch die Iltisleiche gebracht, die man tatsächlich in einem Misthaufen vergraben fand.

Die am 19. Febr., also am 7.—8. Tage nach der Abhäutung und nach Austrocknung bei Zimmertemperatur vorgenommene Untersuchung des Felles ergab folgendes Resultat: Die Haut ist mit dichtem, weichem, bräunlich-schwarzem Fell bedeckt, ohne Kopf, vollständig abgezogen, fast vollständig trocken. Die subkutane Fettschicht, die samt der Haut entfernt wurde, zeigte noch Feuchtigkeit, an einigen Stellen in der Tiefe des Fettes sogar Frische des Gewebes. In der der vorderen linken Extremität entsprechenden Gegend fand man in der Achselbeuge in der Fettmasse eine kleine, stark hyperämierte Drüse. Sonst bot die Haut nichts Besonderes. Auf den aus der gefundenen kleinen Drüse angefertigten Strichpräparaten sah man zahlreiche runde, verschieden geformte, bisweilen ringförmig gefärbte Körner, von denen man nicht bestimmt sagen konnte, ob es bakterielle Involutionsformen oder Mastzellenkörner sind.

Die Impfung an Tieren wurde am 19. Juni in folgender Weise vorgenommen.

Meerschweinchen No. 1 bekam unter die Haut des Kniees eine Emulsion injiziert, die durch Verreibung von Stückchen von subkutanem Bindegewebe aus verschiedenen Partien der Haut, die zuvor mit steriler physiologischer Kochsalzlösung abgewaschen waren, in einer geringen Quantität von 85-proz. Kochsalzlösung gewonnen war.

Meerschweinchen No. 2 wurde mit einem Stückchen subkutanen Bindegewebes aus der Leistengegend teils mit der vorgefundenen Lymphdrüse infiziert, wobei das Material in eine Hauttasche eingeführt wurde.

Meerschweinchen No. 3 wurde in der Weise infiziert, daß in die glatt rasierte Haut des Abdomens (nach der österreichischen Methode) Stückchen von subkutanem Bindegewebe eingerieben wurden.

Meerschweinchen No. 1 ging am 23. Febr., d. h. am 4. Tage, zugrunde.

Sektion: Eitrig hämorrhagisches Infiltrat an der Impfstelle. Stark vergrößerte hämorrhagische linke Leistendrösen und ebensolche linke Axillardrüse. Darmtraktus normal. Leber rein. Milz hochgradig vergrößert, hyperämiert, mit zahlreichen kleinen Nekrosen. Auf den aus den Drüsen der Milz und dem Herzblut gefertigten Strichpräparaten sind zahlreiche typische, sich bipolar färbende Bakterien zu sehen. Die Aussaat aus dem Blut und der Milz gab Pestbacillen in Reinkultur mit Agglutination 1:1000.

Meerschweinchen No. 2 fiel am 24. Febr., d. h. am 5. Tage.

Sektion: Hämorrhagische Leisten- und Axillarbubonen. Darmkanal stark hyperämiert. Retroperitoneale Drüsen vergrößert, hämorrhagisch. Milz um das Vierfache vergrößert, hyperämiert, mit kleinen Nekrosen. Leber zeigt große Nekrosen. Lungen rein. Auf den aus den Bubonen und der Milz gefertigten Strichpräparaten sieht man zahlreiche bipolare Stäbchen. Die Aussaat gab Pestbacillen in Reinkultur mit Agglutination 1:2000.

Meerschweinchen No. 3 fiel am 24. Febr., d. h. am 5. Tage.

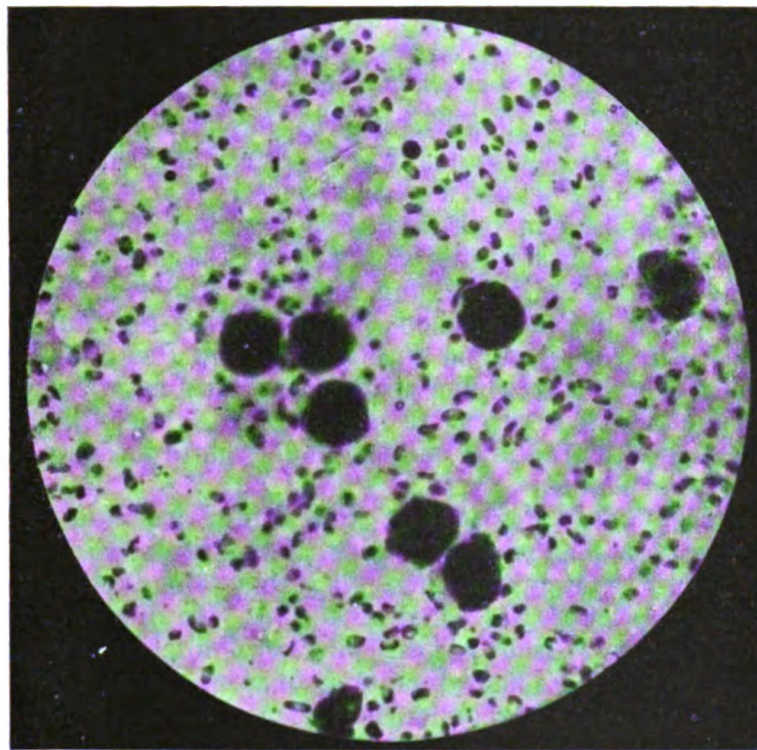
Sektion: Nekrose einer ganzen Strecke, die fast die Hälfte der Bauchoberfläche einnahm, und fast des ganzen rechten Oberschenkels. Ueberall serös-blutiges Oedem. Leistendrösen vergrößert, hämorrhagisch. Milz vergrößert, mit großen Nekrosen. Leber, Lungen normal. Auf den



Strichpräparaten zahlreiche bipolare Stäbchen. Die Aussaat gab jedoch eine Mischung von Pestbacillen mit näher nicht zu bestimmenden septischen Bakterien. Aus der Mischung wurde nach einigen Tagen eine reine Pestkultur gewonnen.

Somit gelang es, festzustellen, daß in der Haut des Iltis sich virulente und lebensfähige Pestbacillen befanden.

Am 22. Febr. wurde, wie oben gesagt, die Iltisleiche der bakteriologischen Station zugeführt. Die Untersuchung der Iltisleiche ergab: Tierleiche in halb vertrocknetem Zustande ohne Kopf mit kurz abgeschnittenen Pfoten. Haut abgezogen. Bauchhöhle weit eröffnet. Baucheingeweide fehlen (augenscheinlich von anderen Tieren ausgefressen). Brustkorb mit dem größten Teil des Halses erhalten. Der Länge und



Präparat aus der Halslymphdrüse des Iltis. Färbung in Giemsa-Lösung.

Dicke nach, sowie nach den Pfoten etc. entspricht der Rumpf vollkommen der früher eingelieferten Haut, so daß das eine und das andere augenscheinlich zu ein und demselben Tiere gehörten.

Bei der Besichtigung der Leiche fand man in der Dicke der halb vertrockneten Halsmuskeln an der linken Seite des Kehlkopfes eine große (bis  $\frac{1}{4}$  cm im Durchmesser) hämorrhagische Lymphdrüse. Lungen und Herz sind gut erhalten und zeigen keine bemerkenswerten Fäulniserscheinungen. Lunge hyperämisiert, flockig. Infarkte und Knoten wurden nicht gefunden. Pleura leer. Herz mit dunklem Blut gefüllt. Die Leiche des Tieres hat sich dank der niedrigen Temperatur (0 bis  $-5^{\circ}$ ) der Luft augenscheinlich gut erhalten, nachdem sie 10 Tage in der Erde gelegen hatte.

Die mikroskopische Untersuchung der aus der Halsdrüse, den Lungen und dem Herzblut gefertigten Strichpräparate ergab eine ungeheure



Anzahl von typischen, sich bipolar färbenden ovalen und runden Pestbacillen (vgl. das Photogramm).

Die Aussaat aus dem Herzblut ergab Pestbacillenkultur, die von spezifischem Serum bei 1:2000 agglutiniert wurde. Ein Meerschweinchen (No. 4), welches das Herzblut subkutan bekam, ging am 4. Tage unter Erscheinungen von typischer hämorrhagischer Pestinfektion zugrunde.

Ein Meerschweinchen (No. 5), dem man in die glatt rasierte Haut Material von der Halslymphdrüse einrieb, fiel am 6. Tage. Bei der Sektion fand man: geringes Oedem an der Einreibungsstelle, typische hämorrhagische Bubonen, Hyperämie und Vergrößerung der Milz mit kleinen Nekrosen. Auf den aus den Bubonen und der Milz gefertigten Strichpräparaten sah man zahlreiche sich bipolar färbende Stäbchen. Aussaat gab Pestbacillen in Reinkultur.

Somit hat die bakteriologische Untersuchung sowohl der Haut als auch der inneren Organe des Iltis mit Sicherheit das Vorhandensein einer Pestinfektion ergeben.

Was die Art und das Genus des Tieres betrifft, so erinnerte dasselbe, trotzdem der Kopf nicht gefunden wurde, durch Haarfarbe, Rumpf- und Schwanzlänge eher an *Putorius foetidus*.

In der uns zugängigen bakteriologischen Literatur fanden wir Fälle von Pesterkrankung von Raubtieren aus der Iltisrasse nicht verzeichnet, jedoch ist eine derartige Erkrankung leicht zu erklären.

Die Iltisse sind die natürlichen Feinde der Ratten, auf die sie gern Jagd machen. In vorliegendem Falle dürfte die Pestinfektion des Iltis am wahrscheinlichsten durch eine pestkranke Ratte hervorgerufen worden sein. Pestkranke Ratten waren zu dieser Zeit in der Nähe des Landhauses, in dem die Erkrankung stattgefunden hatte (in einer Entfernung von ca. 1 km), vorhanden.

In Anbetracht der praktischen Bedeutung, welche der Frage der Infektiösität der von pestkranken Tieren (Tarbaganen, Eichhörnchen etc.) abgezogenen Häute zukommt, haben wir festzustellen versucht, wie lange die Iltishaut ihre Infektiösität behalten könnte. Zu diesem Zwecke legten wir die Haut in eine Glasdose, die mit gewöhnlichem Papier verdeckt war, und ließen sie im Laboratorium bei zerstreutem Licht und einer Temperatur von 13–15° stehen. Am 1. März, d. h. 18–19 Tage nach der Abhäutung des Tieres und am 10. Tage nach der ersten Untersuchung inokulierten wir mit Material aus dem subkutanen Bindegewebe zwei Meerschweinchen (No. 6 und 7). Das Meerschweinchen No. 6 bekam subkutan eine Emulsion, wie sie oben beschrieben wurde. Das Meerschweinchen No. 7 wurde durch Einreibung (nach der österreichischen Methode) infiziert. Leider haben sich die Bedingungen, unter denen die Haut 10 Tage lang aufbewahrt wurde, als ungünstig erwiesen. Infolge der Feuchtigkeit des Raumes bedeckte sich die ganze innere Oberfläche der Haut mit einer dichten Schimmelschicht, die vor der Impfung mechanisch sowohl, wie durch wiederholtes Abwaschen mit sterilisierter 0,85-proz. Chlornatriumlösung entfernt wurde. Das Meerschweinchen No. 6, welches die Emulsion bekommen hatte, fiel am 5. Tage (6. März).

Die Sektion ergab hämorrhagisches eitriges Infiltrat an der Inokulationsstelle, hämorrhagischen linken Leistenbubo, vergrößerte hyperämierte Milz mit Nekrose. Leber und Lungen rein. Auf den aus den Bubonen und der Milz gefertigten Strichpräparaten fand man bipolare Stäbchen in großer Quantität. Aussaat aus Blut und Milz ergab eine

Mischkultur aus Pestbacillen und anderen Mikroben. Aus der Mischung gelang es, Pestbacillen in Reinkultur zu züchten. Meerschweinchen No. 7 blieb am Leben und wurde am 22. März getötet. Die Sektion ergab keine Veränderungen.

Da im vorliegenden Falle die Bedingungen der Aufbewahrung der Haut den natürlichen Bedingungen, wie sie bei der Bearbeitung von Häuten gegeben sind, nicht entsprachen, haben wir die Maximalfrist für die Lebensfähigkeit der Pestbacillen in der Iltishaut nicht feststellen können. Nichtsdestoweniger beweist auch das unter für den Pestbacillus relativ günstigen Bedingungen (Feuchtigkeit) gewonnene Resultat, daß der Pestbacillus im subkutanen Bindegewebe noch nach 18—19 Tagen nach der Abhäutung seine Lebensfähigkeit und Virulenz behalten hat.

Der vorliegende Fall bietet somit Interesse erstens sowohl als der erste zur Veröffentlichung gelangte Fall von Erkrankung eines Raubtieres aus der Iltisrasse, zweitens hinsichtlich des Uebertragungsmodus der Infektion auf den Menschen, der dem Infektionsmodus analog ist, wie er bei denjenigen, die auf solche Tiere Jagd machen, beobachtet wird, und drittens, weil er einen gewissen Beitrag zur Frage der Existenzdauer des Infektionsstoffes in der abgezogenen Haut gibt: die Pestbacillen haben während eines 7—8 Tage langen Trocknens der Haut bei Zimmertemperatur und dann während 10 Tage beim Aufbewahren in feuchter Atmosphäre im subkutanen Bindegewebe ihre Virulenz erhalten. Leider ist das Experiment in dieser Beziehung nicht zum gewünschten Abschluß gelangt.

*Nachdruck verboten.*

## Ueber die pathogene Wirkung des Bacillus abortus Bang.

[Aus dem Laboratorium der vergleichenden Pathologie, Harvard University Medical School, Boston, U. S. A.]

Von Theobald Smith und Marshal Fabyan.

Solange ein Mikroorganismus nur eine Tierart angreift, ist seine Beziehung zur Hygiene und Gesundheitspflege eine untergeordnete, und er bleibt nur einem engen Kreise bekannt. Dies scheint das Schicksal des Bangschen Bacillus bisher geblieben zu sein. Obwohl er von einer Reihe Bakteriologen studiert worden ist, hat er doch ein breiteres Interesse nicht erregt.

Durch den Besitzer einer sehr wertvollen Herde aufgefordert, die Ursachen seiner Verluste durch Verwerfen zu ergründen, haben wir seit Ende 1909 einige Untersuchungen angestellt, die gewisse, wichtige, neue Tatsachen ans Licht brachten und geeignet sind, den Bacillus weiteren Kreisen von Pathologen und Bakteriologen als interessantes Arbeitsobjekt vorzustellen.

Wir gingen an die Arbeit mit desto mehr Eifer, weil zu dieser Zeit noch niemand den Bangschen Bacillus in diesem Lande isoliert hatte. Es lag nahe, zu vermuten, daß vielleicht bei uns das infektiöse Verwerfen einen anderen Erreger habe. Später erschien eine Arbeit MacNeals, die feststellte, daß auch bei uns der B. abortus eine Ursache dieser Krankheit ist.

### Die pathogene Wirkung des *Bacillus abortus* auf Meerschweinchen.

Alle, die sich mit diesem *Bacillus* beschäftigt haben, begnügten sich, die Frage zu beantworten, ob er imstande ist, Abortus hervorzurufen. Bang experimentierte mit Rindern und Schafen; andere, wie MacNeal, mit trächtigen Meerschweinchen. Etwaige andere pathologische Erscheinungen wurden nicht beobachtet. Die geimpften kleinen Tiere blieben am Leben, und selbst lokale Veränderungen blieben aus <sup>1)</sup>.

Durch Zufall wurden wir auf tiefgreifende Gewebsläsionen, die dieser *Bacillus* bei geimpften Meerschweinchen verursacht, aufmerksam gemacht. Bei einem der ersten Fälle wurde uns der Fötus sowie einige Kötyledonen zugesandt. Letztere sahen nekrotisch aus, und da Tuberkulose nicht ausgeschlossen war, wurde gleich ein Meerschweinchen damit geimpft. Zur selben Zeit wurden aus den nicht mehr frischen Kötyledonen *B. coli* und *Proteus vulgaris* auf Agarplatten isoliert. Kulturen von einigen Föten blieben steril. Nach 3 Monaten war das Meerschweinchen noch am Leben. Es hatte unterdessen stark an Gewicht zugenommen. An der Impfstelle war nur eine vorübergehende Geschwulst bemerkt worden, wie es bei Impfungen mit solchem Material auch zu erwarten war.

Als wir daran gingen, die Organe des anscheinend gesunden Tieres zum Besäen von Gärungskölbchen für die Kultur von Anaëroben zu gebrauchen, bemerkten wir eine vergrößerte, blutreiche Milz, die auf einmal unsere Aufmerksamkeit erregte. Die Lymphknötchen der Subcutis waren überall vergrößert, ebenso diejenigen der Bauch- und Brusthöhle. Die Leber zeigte hier und da kleine Einziehungen und winzige, gelbliche Knötchen. Mit Milz und Leber dieses Tieres wurden frische Meerschweinchen geimpft, und nach 3—4 Monaten dieselben Veränderungen gefunden. Die Impfung von Tier zu Tier wurde in diesem ersten Falle mit Erfolg über 18 Monate fortgesetzt. Von einigen Tieren dieser Serie wurde später der Bangsche *Bacillus* in Reinkultur gezüchtet. Unter dessen bekamen wir Material aus anderen Teilen unseres Staates und erhielten in allen Fällen dieselbe sonderbare Impfkrankheit. Auch mit Reinkulturen von diesen Tieren sowie mit Kulturen, die uns Professor Bang und Professor MacNeal gütigst zusandten, erhielten wir dasselbe Krankheitsbild. Nachstehende Tabelle gibt eine Uebersicht über die verschiedenen Impfungen und Kulturserien:

Numer der Kultur	Herkunft	Aus- gangs- material	Meer- schwein- chen organe	Rein- kul- turen	Gewebs- filtrate	Positives Resultat
I	Prof. MacNeal	—	—	5	—	100 Proz.
II	Cotyledo	1	20	7	4	100 Proz. (Meerschweinchen, mit Filtraten geimpft, blieben gesund)
III	Placenta	3	—	4	—	100 Proz.
IV	Prof. Bang	—	—	6	—	100 „
V	Placenta	5	—	4	—	100 „
VI	Scheidenausfluß	2	—	5	—	100 „

Die Impfung der Tiere wurde zuerst mit Suspensionen der eingeschickten Placenta oder des Scheidenausflusses, sowie auch der Organe

1) Preisz, Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Orig. Bd. 33. p. 190.

infizierter Meerschweinchen entweder subkutan oder intraperitoneal ausgeführt. Die Reinkulturen wurden in das Unterhautgewebe oder in die Bauchhöhle geimpft.

Graue und weiße Mäuse, sowie Kaninchen sind auch geprüft worden, doch wollen wir noch nicht ein abschließendes Urteil über die Empfänglichkeit dieser Tiere geben. Suspensionen von Organen der geimpften Tiere geschüttelt und dann durch Berkefeld-Kerzen filtriert, lösten in vier geimpften Tieren keine Krankheit aus. Fütterung von Reinkulturen war in einem Falle negativ. Das Einspritzen von Blutserum eines geimpften Meerschweinchens war auch ohne Erfolg.

Beim Meerschweinchen ist das Krankheitsbild nach kleinen Dosen ohne allgemeine äußerliche Merkmale. Das Gewicht fällt zuerst etwas, um später langsam zu steigen. Der Tod erfolgt nur nach großen Dosen Bacillen, oder durch interkurrente Infektionen. In einem Falle ließen wir ein geimpftes Tier 11 Monate leben. Nur wenn die Herderkrankung gewisse Organe und Gewebe ergreift, kommt die Infektion äußerlich zum Vorschein. Dieses ist der Fall, wenn durch Entzündung die Knochen aufgetrieben und die Gelenke steif werden. In manchen Fällen ist ein Auge ergriffen. In einem Falle war das Hinterteil des Tieres völlig gelähmt. In einem Falle starb ein Tier infolge von Milzruptur.

Mit wenigen Ausnahmen wurden die geimpften Tiere mit Chloroform getötet. Bei allen war eine mehr oder weniger ausgesprochene Polyadenitis bemerkbar. Bei Eröffnung der Bauchhöhle fiel gleich die große, blutreiche Milz auf, deren Gewicht bis zu achtmal des normalen angetroffen wurde. Die Leber war in Farbe oder Konsistenz nicht merkbar verändert. Oefers war die Oberfläche durch kleine Narben eingezogen. Selten fehlten winzige, gelbliche Knötchen, die aber nicht zahlreich waren. Die Nieren waren mitunter ganz normal, mitunter schwer mitbeteiligt und dann weißlich und dabei vergrößert. Oefers war die Rindenschicht mit kleinen, grauen Herden durchsetzt. Eine Mitbeteiligung des Geschlechtsapparates bei weiblichen Tieren haben wir noch nicht genau feststellen können, aber bei männlichen sind die Hoden fast immer atrophisch, oder auch etwas höckerig vergrößert. Die Lungen waren öfters mit kleinen, grauen Flecken besetzt, die Tuberkeln ähnelten.

Knochenaffektionen waren bei einem Bruchteil der Tiere vorhanden. Die am meisten ins Auge fallende Veränderung war eine gleichförmige Auftreibung einer oder mehrerer ganzen Rippenknochen, und eine korrespondierende Vergrößerung der Markhöhle. In einem Falle waren die Nackenwirbel, im anderen die Knochen der Füße aufgetrieben. Eine Inzision in diese tumorartige Schwellungen brachte eine etwas dicke, eiterähnliche Substanz hervor.

Diesen proteus-artigen Veränderungen liegt ein chronischer, entzündlicher Prozeß zugrunde, der demjenigen der Tuberkulose sehr nahe steht und in manchen Beziehungen mit ihm übereinstimmt. Die Veränderungen sind entweder herdförmig oder mehr diffus, oder man begegnet beiden zusammen. In den herdförmigen Läsionen findet man fast immer Zellen mit großem, bläschenförmigem, sehr chromatinarmem und etwas aufgetriebenem Kern. Das Protoplasma färbt sich schlecht. Diese Zellen, die wir Epithelioidzellen nennen wollen, weil sie den großen Zellen des Tuberkels gleichen, und Lymphoidzellen in größerer oder kleinerer Zahl sind die Hauptelemente der kleinen Herde. In seltenen Fällen ist das Zentrum nekrotisch. In den mehr diffusen Ver-

änderungen begegnet man denselben großen, epithelioiden Elementen, besonders in der Medulla der Lymphdrüsen zusammen mit lymphoiden Zellen und Gruppen von Plasmazellen. Mitosen sind immer zu finden, oft zahlreich. Polymorphkernige Leukocyten durchdringen in den meisten Fällen in kleiner Zahl die veränderten Gewebe. Die Lymphgefäße in der Umgebung der Herde sind fast immer mit Lymphzellen gefüllt. Diese Beschreibung gilt für die meisten Fälle, nur ist das Verhältnis von großen zu lymphoiden Zellen sehr schwankend. Riesenzellen sind manchmal, besonders in der Milz, zu finden. In einigen Fällen war die entzündliche Neubildung weiter fortgeschritten, und Anzeichen von bindegewebiger Organisation waren vorhanden.

In der Milz war die Neubildung mehr diffus, und die Vergrößerung des Organs zum Teil der Zellvermehrung in der Pulpa zuzuschreiben. Den größten Anteil hatte die Blutstauung, die sich durch die Anwesenheit vieler großen Lakunen kundgab, die mit roten und weißen Blutzellen gefüllt waren.

In den Lymphknoten war die Veränderung fast ganz auf das Zentrum beschränkt, wo die Anwesenheit von Haufen epithelioider Zellen dem Gewebe ein rarefiziertes Aussehen, wie bei frischer Tuberkulose, gab.

In der Leber sind die Veränderungen zum Teil herdförmig, wie Tuberkeln, im Lebergewebe zerstreut und zum Teil im periportalen Gewebe lokalisiert. Hier wird durch die Anhäufung von Zellen ein Druck auf die Gefäße ausgeübt. Dieser Druck zeigt sich in den stauungsartigen Erweiterungen der Gallengänge. Wahrscheinlich ist die Ursache der Blutstauung in der Milz zum Teil hier zu finden.

In den Nieren ist die Entzündung diffus und herdförmig und fast ganz auf die Rindenschicht beschränkt. Hier ist besonders die Ansammlung von lymphoiden Zellen um die großen Venen auffallend. Herdweise Zellanhäufungen findet man auch in der Papilla.

In den Lungen sind die Veränderungen selten von Bedeutung. Hier findet man perivaskuläre Zellanhäufungen, sowie kleine Herde durch das Parenchym verstreut.

Die Knochenveränderungen sind am besten in Querschnitten von entkalkten Rippen zu sehen. Die Knochensubstanz wird vom Markraume aus zerstört und ist teilweise oder ganz verschwunden. An der Peripherie ist durch entzündliche Neubildung ein großmaschiges Balkengewebe entstanden, welches zwei- oder dreimal so breit ist als der primäre Rippenknochen.

Nur ein Auge haben wir bisher mikroskopisch untersucht. Der Sitz der Veränderungen war die Sklera, Chorioidea, die Lider und die Tränen-drüse. Auch die Cornea war aufgelockert und das Epithel nekrotisch. Die Veränderungen waren von derselben Art, wie schon beschrieben.

Schließlich sei noch die Rückenmarksentzündung in einem Falle von Lähmung der Hinterhand erwähnt. Beim Herausnehmen des Markes war eine stark gefüllte Vene auf der dorsalen Medianlinie des Rückenmarkes im Bereiche des Lendenmarkes zu sehen. Die mikroskopische Untersuchung ergab eine entzündliche Verdickung der Venenwand. Die Zellen waren auch hier größtenteils große, endotheliale Elemente. Mehr zufälligerweise wurden zellige Infiltrate auch in einer Nebenniere und in einem benachbarten Nervenganglion gefunden.

In den entzündeten Geweben des Meerschweinchens sind die Bacillen schwer zu finden. In Schnitten, die mit Eosin und alkalischem Methylen-

blau gefärbt sind, haben wir sie nicht finden können. In Schnitten, die mit Anilingentian-violett gefärbt und dann in 0,1-proz. Essigsäure leicht entfärbt sind, findet man hie und da Zellen mit polymorphem Kern, deren Protoplasma mit den winzigen Bacillen vollgepfropft ist. Anscheinend sind sie nie sehr zahlreich, und in dieser Beziehung haben sie wieder etwas mit dem Tuberkelbacillus gemein. Wahrscheinlich kann in der Färbetechnik des Bacillus noch viel Besseres geleistet werden. Nach den aufgegangenen Kulturen zu schätzen, sind die Bacillen am zahlreichsten in der Milz des geimpften Meerschweinchens. Dann kommen Lymphdrüsen, Mark der erweiterten Rippenknochen, Leber, Niere und Lunge.

#### Die Kultur des Bacillus abortus Bang.

Die Kultur gelang Bang und Stribolt in hohen Schichten eines Nährbodens, der aus Agar, Gelatine und Blutserum zusammengesetzt war. Bei unseren ersten Versuchen wurden neben den gewöhnlichen Nährböden auch Blutserum und Einährböden verwandt und die Kulturen ausschließlich mit Geweben von infizierten Meerschweinchen angelegt. Zu dieser Zeit fahndeten wir nach einem anderen Erreger, da die Impfkrankheit bei Meerschweinchen noch von niemandem gesehen worden war. Es lag nahe, an einen Mikroorganismus, der dem Tuberkelbacillus verwandt ist, zu denken. Selbst nach 4 Wochen war kein Wachstum in unseren Kulturen zu sehen. Nur in einem Gärungskölbchen war eine Mischkultur aufgegangen, die dann durch einige Generationen fortgezüchtet wurde und später die typische Impfkrankheit beim Meerschweinchen erzeugte. Zufällig wurde unsere Aufmerksamkeit auf eine soeben erschienene Arbeit von Mac Neal und Kerr<sup>1)</sup> gelenkt, die die Bangschen Abortbacillen nach der Methode von Nowack<sup>2)</sup> direkt gezüchtet hatten. Eine Kultur Mac Neals gab mit dem Blutserum unserer geimpften Meerschweinchen eine hohe Agglutination, und bei Anwendung der Nowackschen Methode erhielten wir Reinkulturen des Bangschen Bacillus. Diese Methode besteht nämlich in dem Gebrauch einer Agarkultur des Heubacillus, die mit den geimpften Röhrchen in einem Gefäße luftdicht verschlossen wird. Der Heubacillus soll nämlich durch eine Verminderung der Sauerstoffspannung das Wachstum des Bacillus abortus fördern. Mit dieser Methode konnten wir aus allen untersuchten Meerschweinchen sowie aus Placentargewebe den B. abortus züchten. Da die Kulturen auf schräg erstarrtem, gewöhnlichem Agar gut wachsen und isolierte Kolonien leicht zu gewinnen sind, ist diese Nowacksche der Bangschen Methode weit überlegen.

Nach einer oder zwei Ueberimpfungen konnten wir die Heubacilluskultur entbehren, denn die Bacillen wuchsen dann in unseren Händen wie die gewöhnlichen Bakterien, auch ohne Zusatz zum Fleischpeptonagar. In einigen Fällen wurde primäres Wachstum erzielt ohne künstliche Hilfe. Wo aber hier nur einzelne Kolonien aufgingen, wuchsen zahlreiche in Röhrchen zusammen mit dem Heubacillus. Manche Bakterien, so B. megatherium und B. coli, können B. subtilis ersetzen. Mit anderen schwächer wachsenden Organismen konnten wir nichts bezwecken.

Ohne uns hier in Details einzulassen, die wir später mit noch anderen Versuchen zu veröffentlichen gedenken, möchten wir auf einige

1) Journ. Infect. Dis. Vol. 7. 1910. p. 469.

2) Annal. de l'Inst. Pasteur. Vol. 22. 1908.



Tatsachen aufmerksam machen, die wir bei der Kultur gesammelt haben. Die Einzelkolonien auf Agar werden, wenn sie nicht zahlreich sind, ziemlich dick, kreisrund, deckelartig und oft 5 mm im Durchmesser. Sie haben einen leicht gelblichen Schimmer. Das Kondenswasser wird sehr trübe. Der Belag auf der Agaroberfläche älterer Kulturen ist grau, etwas feucht glänzend, ohne Besonderheiten. Auf Kartoffeln wächst der Bacillus gut, nachdem die Akklimatisation sich eingestellt hat. Die bräunliche Farbe erinnert an ältere Rotzkulturen auf Kartoffeln. Gewöhnliche Bouillon (aus frischem Rindfleisch) wird zuerst schwach trübe. Nach einigen Wochen senken sich die Bacillen zu Boden und die Flüssigkeit wird wieder klar. Den Bodensatz kann man zu einem dicken Strang aufwirbeln. Er ist also zum Teil fadenziehend.

In Milch vermehrt sich der Bacillus, ohne augenscheinliche Veränderungen zu bewirken. Die Reaktion wird weniger sauer und erreicht beinahe den Nullpunkt des Phenolphthalein<sup>1)</sup>. Dasselbe ist der Fall in Bouillon, welche Dextrose, Saccharose und Laktose enthält. Das Wachstum bleibt in jedem Falle auf den offenen Schenkel des Gärungskölbchens beschränkt. Diese Zuckerarten werden also nicht angegriffen.

Kulturen, die einmal auf den gewöhnlichen Substraten ohne künstliche Hilfe gedeihen, verlieren diese Eigenschaft durch eine Tierpassage nicht. Diese Tatsache gilt auch für Tuberkelbacillen, und ist öfters von einem von uns und von anderen beobachtet worden.

Die verschiedenen Tatsachen, die von früheren Beobachtern und von uns gesammelt worden sind, sind nicht geeignet, eine rationelle Erklärung der Wachstumseigentümlichkeiten dieses Bacillus zu liefern. Obwohl er sich in unseren Händen als ein obligat aërobes Bakterium benimmt, so wird er doch von anderen als ein fakultativ anaërobes Bakterium betrachtet. Sein Wachstum ist durch reinen Sauerstoff sowie auch durch Kohlensäure angeregt worden. Die Brücke vom parasitischen zum saprophytischen Wachstum kann augenscheinlich durch sich bakteriologisch schroff gegenüberstehende Prozeduren gebildet werden. Diese an sich genügt, um zu beweisen, daß wir diesen Uebergang nicht verstehen.

Die neuen Tatsachen, die wir hier vorbringen, machen es fast zur Gewißheit, daß das seuchenhafte Verwerfen der Rinder in allen Ländern durch den Bacillus abortus verursacht wird. Die negativen Resultate, die von verschiedenen Forschern berichtet worden sind, waren wohl in allen Fällen den unzulänglichen Kulturmethoden zuzuschreiben. Die Meerschweinchenimpfung wird in Zukunft in zweifelhaften Fällen zum Ziele führen.

Auch wird die Erklärung des pathologischen Prozesses, die Bang am Anfange gegeben hat, vielleicht zu modifizieren sein. Der Uterinkatarrh, auf den Bang hindeutet, ist wahrscheinlich nur eine sekundäre Erscheinung, welcher sehr langsame Veränderungen an den Kotyledonen vorangehen. Das spärliche Material, welches wir bisher untersuchen konnten, deutet auf eine Veränderung der Kotyledonen, wie sie z. B. in der Milz der geimpften Meerschweinchen vor sich geht.

Während der Untersuchung kam uns der Gedanke, daß vielleicht schon früher diese Impfkrankheit der Meerschweinchen spontan oder im Laufe anderer Untersuchungen aufgetreten und von früheren Forschern bereits beschrieben worden sind. Die weite Verbreitung des infektiösen

1) Preisz (l. c.) hat Koagulation der Milch beschrieben. Wahrscheinlich handelte es sich um eine Mischkultur.

Abortus und die reichliche andauernde Ausscheidung der Bacillen, wie sie schon beschrieben worden ist, machten solche Vermutungen der Nachprüfung wert. Wir durchsuchten im besonderen die Literatur der Tuberculose zoogloeiue, wie sie zuerst von Malassez und Vignal im Jahre 1883 beschrieben wurde, sowie auch die umfangreiche Literatur der Pseudotuberculose. In keinem Falle konnten wir irgendwelche Uebereinstimmung mit unserer Impfkrankheit feststellen.

Daß der Abortbacillus mitunter in der Milch vorkommt, ist sehr wahrscheinlich, und es würde uns nicht befremden, wenn gelegentlich die besondere Impfkrankheit, die dieser Bacillus verursacht, unter den vielen Meerschweinchen, die in den letzten 20 Jahren mit Milch geimpft worden sind, aufgetaucht und als Tuberculose gedeutet worden wäre<sup>1)</sup>.

### Schlußfolgerungen.

1) Der B. abortus Bang ist höchstwahrscheinlich der einzige Erreger des seuchenhaften Verwerfens der Rinder.

2) Der B. abortus ruft in Meerschweinchen eine eigenartige, allgemeine Impfkrankheit hervor, die nur selten zum Tode führt. Sie gleicht der Tuberculose, und ist charakterisiert durch chronische, interstitielle Neubildungen, die zum größten Teil aus epithelioidartigen und lymphoiden Zellen bestehen.

3) Der B. abortus kann in der Milch vorkommen, und es ist daher angezeigt, nachzuforschen, ob er in irgendwelchem kausalen Verhältnis zu den Organ- und Gewebssklerosen oder anderen chronischen Krankheiten des Menschen und der Haustiere steht.

---

1) Das Vorkommen des B. abortus in der Milch ist durch eine frühere Beobachtung des Unterzeichneten festgestellt. In Untersuchungen über den Tuberkelbacillengehalt der Milch, die ich durch den Assistenten E. C. Schroeder im Jahre 1893 und 1894 anstellen ließ [Investigations concerning bovine Tuberculosis etc. (Bureau of Anim. Industry. Bull. No. 7. Washington 1894. p. 80)], stieß ich auf ein Meerschweinchen, dessen Gewebsveränderungen damals einen großen Eindruck auf mich machten. Es war 3 Monate nach der intraabdominalen Injektion von zentrifugierter Milch getötet worden. Während dieser Zeit verlor das Tier, welches am Anfange ungefähr 336 g wog, nur 28 g. Bei der Autopsie war die Leber blaß und mit kleinen, grauen oder gelblichen Knötchen durchsetzt. Die Dimensionen der Milz waren vielleicht 5mal vergrößert. Die Nieren erschienen als zwei weißliche Tumoren. Tuberkelbacillen waren nicht zu finden. Die mikroskopische Untersuchung ergab eine interstitielle Entzündung des Nierengewebes. Die verschiedenen Strukturen der Rindenschicht waren durch reichliche Zellwucherung und Infiltration auseinander getrieben und zum Teil atrophisch. Die Knötchen in der Leber waren aus Rundzellen zusammengesetzt.

In einer Anmerkung zu dieser Arbeit warnte ich vor einer Verwechselung dieser Impfkrankheit mit Tuberculose. Seit jener Zeit habe ich immer wieder auf diese Krankheit gefahndet, aber ich bin ihr nicht wieder begegnet. Jetzt, nach 17 Jahren, kann ich sie als aufgeklärt betrachten. Damals vermutete ich eine Erkrankung durch einen Keim, der zufällig in die Milchprobe gekommen war. T. S.

*Nachdruck verboten.*

## Die Schutzwirkung der Kapsel für den Milzbrandbacillus.

Erwiderung auf den in dieser Zeitschrift, Bd. 60, Heft 1—2 erschienenen Artikel: Nochmals zur Schutzwirkung der Milzbrandkapsel.

Von Prof. Dr. **Hugo Preisz** in Budapest.

In dieser Zeitschrift (Bd. 55) habe ich unter dem Titel: „Zur Frage der Schutzwirkung der Kapseln beim Milzbrandbacillus“ eine ebenda (Bd. 51) erschienene Arbeit von F. Fiscoeder auf Grund von mir schon vor dem veröffentlichten (Bd. 49) Versuchsergebnissen einer Kritik unterzogen. Die hierauf von F. Fiscoeder in Bd. 60 erschienene Replik veranlaßt mich nun, in dieser Sache mein folgendes Schlußwort zu äußern:

Herr F. Fiscoeder sagt in seiner Originalarbeit: „Ich habe zu diesen Versuchen 12—14-stündige, bei 37° C aus Sporen ausgekeimte Schrägagar- oder Bouillonkulturen verwendet, weil ich durch meine bereits angegebenen Versuche festgestellt habe, daß in derartigen Kulturen nur wenig Stäbchen in Zerfall begriffen sind und die Anzahl der Sporen, wenn sie überhaupt vorhanden sind, nur sehr gering ist.“ Zum Schlusse seiner Replik aber schreibt Herr F. Fiscoeder: „Den Hauptvorwurf, den Preisz gegen meine Versuche erhoben hat, daß nämlich meine Kulturen sporenhaltig gewesen wären, habe ich als unbegründet zurückgewiesen.“

Herrn F. Fiscoeder kam es also bei seinen Versuchen darauf nicht an, ob eine geringe Anzahl von Sporen vorhanden war, oder nicht.

Jeder Sachverständige wird hieraus beurteilen können, welche Beweiskraft seinen Versuchen den meinigen gegenüber zukommt. Dennoch sei mir gestattet, noch folgendes zu bemerken:

Wenn es Herrn Fiscoeder schwer fällt, zu glauben, daß ich tatsächlich mit sporenfreiem Material gearbeitet habe, und er ferner auch befürchtet, ich hätte mit „krüppelhaft entwickelten“ Milzbrandstäbchen experimentiert, so sind dies ganz willkürliche, unbegründete Annahmen; da müssen Versuche reden<sup>1)</sup>.

1) Mein sporenfreies Bacillenmaterial bildete bei Zimmertemperatur so lange gewachsene Agarkulturen, bis der Rasen schon makroskopisch gut sichtbar gewesen; nun wurden stets mohnkorngroße Teilchen des Rasens auf ein Deckglas mit einem kleinen Tropfen stark verdünnter Fuchsinlösung vermischt, mit einem Deckglas bedeckt und mit Immersion untersucht. In einem solchen vital gefärbten Präparat bleiben die Bacillen durchsichtig und lassen nicht nur die fertigen Sporen, sondern auch deren verschiedene Entwicklungsstadien ganz leicht erkennen (s. meine Arbeit in Bd. 35 dieser Zeitschrift). Sobald ich auf diese Weise in den Kulturen nicht nur Sporen, sondern auch nur eine lebhaftere Anschickung zur Sporenbildung beobachtete, kamen sie nicht mehr zur Verwendung. Leicht kann sich jeder Bakteriologe überzeugen, daß man auf diese Weise sporenfreie Bacillen erhalten kann. Wiederholt verschaffte ich mir auch durch Erhitzung Gewißheit, daß die nach dem angegebenen Verfahren sporenfrei befundenen Kulturen es tatsächlich waren. Allerdings kann man durch Impf- und Züchtungsversuche nach vorheriger Erhitzung feststellen, ob in einer Kultur Sporen vorhanden sind oder nicht. Bekanntlich keimen aber Sporen zuweilen sowohl im Tierkörper, wie in der Kultur sehr zögernd aus. Besitzt man nun eine für das Experiment der Widerstandsfähigkeit der sporenlosen Milzbrandstäbchen bestimmte Kultur und wollte man einen Teil derselben auf seine Sporenlosigkeit durch Impf- und Züchtungsversuche nach vorheriger Erhitzung prüfen, wie müßte man den anderen Teil kon-

Ich habe, mit sporenfreiem Material arbeitend, nachgewiesen (diese Zeitschrift, Bd. 49), daß bekapselte Stäbchen in der Subcutis von Tauben und Hühnern 2—4 Tage länger leben, als unbekapselte Stäbchen desselben Stammes; ferner, daß bekapselte Stäbchen mit Serum hoch immunisierte Mäuse sicher töten, unbekapselte Stäbchen dagegen dies nicht vermögen. Diese Tatsachen dürfen nicht ohne Nachprüfung mit sporenfreiem Material einfach geleugnet und ignoriert werden, wie es Herr Fischhoeder getan.

Ich habe in einer mittlerweile erschienenen Arbeit (diese Zeitschrift, Bd. 58) in Wort und Bild dargetan, wie die verschiedenen abgeschwächten Varietäten des Milzbrandbacillus je nach dem Grade ihres Kapselbildungsvermögens und der mehr oder minder festen Konsistenz ihrer Kapseln bei verschiedenen Versuchstieren früher oder später zugrunde gehen und dementsprechend mehr oder minder virulent sind.

Wenn mir der Nachweis nicht gelungen ist, daß die gelöste Kapselsubstanz (Anthracomucin) Versuchstieren verabreicht, die Inkubation für Milzbrand abkürzen, oder unempfindliche Tiere empfindlich machen, oder endlich avirulente Milzbrandstämme virulent machen könnte, so liegt doch hierin kein Beweis gegen die Schutzkraft, der die Bacillen umgebenden Kapseln, wie Herr Fischhoeder ganz fälschlich gegen mich argumentiert. Die den Bacillus umhüllende Kapsel hat doch augenscheinlich für den Bacillus eine ganz andere Bedeutung, als die von ihm losgelöste Kapselsubstanz. Ein Bleimantel kann einem Kupferstäbchen in Schwefelsäure einen Schutz gewähren; dieser Schutz aber fällt weg, sobald der Bleimantel sich in der Schwefelsäure irgendwie zerteilt und letztere nicht, oder nur unvollkommen neutralisiert. Kapseln um Bacillen einerseits, und Kapselstoff in der Umgebung von Bacillen andererseits sind zwei ganz verschiedene Dinge, die ich niemals verwechselt habe.

Budapest im September 1911.

*Nachdruck verboten.*

## Erwiderung auf den Artikel des Herrn Prof. Dr. Miessner „Die Milzruptur bzw. perakute Form der Hämoglobinurie des Rindes“.

Von Dr. Paul Knuth,

Abteilungsvorsteher am Hygienischen Institut der Kgl. Tierärztlichen Hochschule zu Berlin.

Die Schlußsätze des oben genannten im Bd. 60. H. 3/4 dies. Centralblattes abgedruckten Artikels geben mir Veranlassung zu folgenden Bemerkungen: Es muß zu einer irrigen Auffassung führen, wenn Herr

servieren, um ihn nach einigen Tagen, nachdem der Impf- und Zuchtungsversuch tatsächlich das Fehlen von Sporen erwiesen, noch immer als sporenfrei verwenden zu können? Diese noch ungelöste Schwierigkeit nötigte mich, zur Gewinnung sporenloser Bacillen mein obiges Verfahren zu wählen. Ich will hierzu nur noch bemerken, daß bei meinen mit sporenfreien Bacillen jahrelang fortgesetzten Versuchen sehr verschiedene Milzbrandstämme zur Verwendung kamen; sobald die täglich ein- oder zweimalige Fortimpfung auf Agar bereits eine längere Serie erreichte und ich eine Abnahme der Virulenz feststellen konnte, so schritt ich zu einem neuen Stamm.

Miessner schreibt: „Das Verdienst, auf diese Form der Hämoglobinurie der Rinder zuerst hingewiesen zu haben, gebührt Witt (Berl. tierärztl. Wochenschr. 1908. p. 625). In diesem Jahre haben dann Knuth und Meissner in Schleswig-Holstein ähnliche Beobachtungen gemacht. Ueber die Art der dabei nachgewiesenen Blutparasiten wollen sie vorläufig ein entscheidendes Urteil noch nicht fällen“.

Hiernach könnte es scheinen, als ob ich die bei der Milzruptur gefundenen Gebilde nicht als Piroplasmen erkannt hätte. Demgegenüber möchte ich betonen, daß ich von vornherein sowohl mündlich wie schriftlich in dem amtlichen Berichte über meine Befunde in Schleswig-Holstein, wie auch ganz besonders in meinen Publikationen in No. 25 und 31 der Berl. tierärztl. Wochenschr. die fraglichen Gebilde als Piroplasmen erklärt habe.

In meiner ersten Publikation (Berl. tierärztl. Wochenschr. No. 25) hatte ich mich unter anderm folgendermaßen ausgesprochen:

„Bei der Untersuchung der von Kreistierarzt Wulff eingesandten Milzausstriche und der von uns selbst aus der Milz angefertigten Präparate fanden wir sowohl endoglobuläre wie extraglobuläre, kleine, runde, teils einzeln, teils zu zweien liegende, als auch große birnförmige, große runde und große amöboid gestaltete Gebilde, die die allergrößte Ähnlichkeit mit dem Erreger des Texasfiebers bzw. der Hämoglobinurie der Rinder in Deutschland (*Piroplasma bigeminum* bzw. *Piroplasma bovis*) besitzen. Ob die in den Milz- und Herzmuskelausstrichen gefundenen, runden, sowohl auf den roten Blutkörperchen wie auch außerhalb derselben befindlichen protozoischen Gebilde Entwicklungsstadien der großen, für Texasfieber bzw. Hämoglobinurie der deutschen Rinder charakteristischen Parasiten der roten Blutkörperchen darstellen oder nicht, scheint mir noch zu wenig geklärt zu sein, um hierüber schon heute ein Urteil abgeben zu können. Bekanntlich sind beim Texasfieber und bei der Hämoglobinurie der deutschen Rinder in den inneren Organen ebenfalls kleine, runde Blutparasiten gefunden worden. Meistens wurde angenommen, daß diese runden Formen postmortal aus den birnförmigen und ovalen Formen entstanden sind. Hiernach könnten zwar mit einigem Recht die von uns gefundenen, verschieden gestalteten Parasiten als eine Einheit aufgefaßt werden. Andererseits verdient aber die Tatsache, daß die Rinder ohne nennenswerte Krankheitserscheinungen plötzlich sterben und daß bei den Obduktionen dieser Rinder so häufig Milzruptur und Verblutung in die Bauchhöhle beobachtet wird, und vor allem das Fehlen der Hämoglobinurie, die sorgfältigste Beachtung. Denn bisher sind weder beim Texasfieber noch bei der Hämoglobinurie der deutschen Rinder Milzruptur und Verblutung in die Bauchhöhle beobachtet worden. Es wäre daher sehr wohl möglich, daß bei den in Nordschleswig beobachteten Fällen von Milzruptur beim Rinde eine Mischinfektion von Piroplasmen mit anderen Infektionserregern vorliegt, oder aber daß es sich um eine besondere Krankheit handelt und das von uns gefundene *Piroplasma* eine neue Art darstellt. Erst weitere Untersuchungen können hierüber Klarheit bringen. Selbst wenn man annehmen wollte, daß die in Schleswig von Milzruptur usw. befallenen Rinder von Natur außerordentlich empfänglich für Piroplasmen sind, weil sie aus irgendwelchen Gründen in ihrer Jugend die Piroplasmose noch nicht überstanden haben, so dürfte dies doch noch nicht die häufig auftretende Milzruptur und den raschen Tod erklären. Denn nach meiner Erfahrung aus Uruguay sterben selbst die hochgezüchteten, aus England nach Südamerika importierten Rinder niemals so plötzlich, jedenfalls nicht ohne vorhergehende, mindestens 8 Tage lang dauernde Krankheit. Auch kann ich mich nicht entsinnen, jemals bei solchen Tieren Milzruptur gesehen zu haben.“

Hierzu kommt noch, daß wir bei der Sektion der beiden Rinder aus den Kreisen Hadersleben und Tondern zwei Erscheinungen vermißt haben, die für Texasfieber und die Hämoglobinurie der deutschen Rinder typisch sind: Das ist erstens die klümprige Beschaffenheit der Galle und zweitens der mehr oder weniger rote Harn. Bei dem Rinde im Kreise Tondern fanden wir außerdem noch eine blutige Entzündung einiger Fleischlymphdrüsen. Auch hierdurch unterscheidet sich die in Frage stehende Erkrankung wesentlich vom Texasfieber und der Hämoglobinurie der deutschen Rinder, bei der solche Lymphdrüsenveränderungen bisher nicht beobachtet wurden.“

Hiernach dürfte es wohl keinem Zweifel unterliegen, daß ich bereits in meiner ersten Publikation vom 22. Juni in No. 25 der Berl. tierärztl. Wochenschr. die von mir gefundenen Blutparasiten als Piroplasmen erkannt habe.

Nach den Schlußsätzen in dem Artikel des Herrn Miessner könnte es aber ferner scheinen, als ob ich mich erst nach Herrn Miessner mit den Milzrupturen beschäftigt habe. Dies wäre ganz unzutreffend. Erst durch meine erfolgreichen Untersuchungen in Schleswig-Holstein ist die allgemeine Aufmerksamkeit der Tierärzte auf die Milzrupturen hingelenkt worden. Denn Herr Miessner gibt selbst an, daß nach Kreistierarzt Dr. Pilwats Beobachtung derartige Fälle ein ganz gewöhnliches Vorkommnis gewesen seien, daß man aber möglicherweise solche Fälle früher einfach dem Milzbrande zugerechnet und ihnen deshalb besondere Beachtung nicht geschenkt habe. Auch ist es nicht richtig, das Verdienst des Herrn Witt hinsichtlich der Aetiologie so sehr zu betonen, da Witt die Piroplasmennatur der fraglichen Gebilde nicht erkannt, sondern stets von „Malaria“ gesprochen hat. Das Verdienst, die Piroplasmennatur der Krankheit erkannt zu haben, dürfte ich vielmehr beanspruchen, wenn es überhaupt als etwas Besonderes angesehen werden darf, da bereits der Holländer De Jong im Jahre 1904, wie ich erst nachträglich gelesen habe, bei Fällen von Milzruptur des Rindes Piroplasmen gefunden und sehr sorgfältig beschrieben hat.

Was die von Herrn Miessner erwähnten Fälle aus Westfalen und Westpreußen anbetrifft, so möchte ich bemerken, daß ich aus jenen Provinzen (Kreis Warendorf und Dirschau) infolge meines ersten Artikels vom 22. Juni in der Berl. tierärztl. Wochenschr. bereits am 24. Juni, also schon ca. 14 Tage früher als Herr Miessner, Material bzw. Nachrichten über das Auftreten von Milzrupturen erhalten habe.

Im übrigen habe ich in einem von mir am 19. September d. J. in Dresden anläßlich der Tagung der Deutschen tropenmedizinischen Gesellschaft gehaltenen Vortrage ohne Kenntnis von der gleichen Auffassung des Herrn Miessner der Meinung Ausdruck gegeben, daß ich die plötzlichen Todesfälle beim Rinde infolge Milzruptur bis auf weiteres als eine perakute Form der Piroplasmose ansehen mußte.

Was schließlich die von Herrn Miessner erhobenen Sektionsbefunde und Schlußfolgerungen anbetrifft, so habe ich daran folgendes als von meinen Befunden abweichend zu bezeichnen:

1) Bei keinem der 3 von Herrn Miessner erwähnten Fälle ist ausgesprochen, daß wirklich eine Milzruptur vorgelegen hat, trotzdem nach der Ueberschrift dies vermutet werden mußte.

2) Nach Herrn Miessners Untersuchungen (p. 249) sollen Fälle von Milzruptur stets dort beobachtet werden, wo auch Hämoglobinurie auftritt. In dieser allgemeinen Fassung dürfte dies wohl sicher nicht zutreffen. Denn beispielsweise betonen gerade die Kreistierärzte Schröder in Tondern und Schüller in Apenrade, daß in denjenigen Ortschaften, in denen Milzrupturen auftreten, Hämoglobinurie völlig unbekannt ist.

3) Der Erklärungsversuch des Herrn Miessner für das Zustandekommen der Milzruptur durch die Anhäufung der Piroplasmen in der Milz steht mit meinen Beobachtungen über die Zahl der in der Milz gefundenen Parasiten nicht im Einklang, geht übrigens auch nicht aus den von Herrn Miessner selbst erhobenen Befunden hervor.

4) Wenn Herr Miessner sagt: Es könnte immerhin die Möglichkeit bestehen, daß wir es im vorliegenden Falle mit der Anaplasmosis zu tun haben, so muß ich hierzu bemerken, daß ich dies nach meinen in dieser Richtung besonders eingehenden Untersuchungen für ausgeschlossen



halte. Ich kenne das sogenannte *Anaplasma marginale* sehr gut, da ich bereits 1902, nach Smith und Kilborne als einer der ersten, diese Gebilde im Blute südamerikanischer Rinder festgestellt habe. Cf. Knuth, Experimentelle Studien über das Texasfieber in den La Plata-Staaten p. 29—34. Auch ist mir die spätere Literatur über diese Pünktchen gut bekannt. Wie ich bereits in No. 31 der Berl. tierärztl. Wochenschr. näher ausführte, haben auch wir sehr häufig dem *Anaplasma marginale* ähnliche Gebilde in einer größeren Zahl von Blutaussstrichen gefunden. Ich halte es aber für ausgeschlossen, daß dieselben parasitären Ursprungs sind.

5) Herrn Miessner ist es bei seinen 3 Fällen, bei denen es zweifelhaft erscheint, ob überhaupt eine Milzruptur vorgelegen hat, anscheinend nicht aufgefallen, daß die Galle nicht schleimig-klümpig, sondern hellgelb und klar aussah. Hierdurch unterscheiden sich aber gerade die von uns beobachteten und genauer untersuchten Fälle von der gewöhnlichen Hämoglobinurie des Rindes und dem Texasfieber, bei dem die Galle stets schleimig-klümpig ist.

6) Was endlich die Uebertragungsversuche mit Material von Milzrupturen anbetrifft, so möge bemerkt sein, daß wir unter 3 derartigen Versuchen nur einmal Piroplasmen im Blute der Impflinge erzielten.

Wenn ich also einerseits mit Herrn Prof. Dr. Miessner auch darin übereinstimme, daß die Fälle von Milzruptur als eine perakute Form von Piroplasmose zurzeit anzusehen sind, so möchte ich doch auch andererseits die beiden Möglichkeiten vorderhand noch offen halten, die ich in meinem Dresdner Vortrage angeführt habe. Ich halte es nämlich noch nicht für ausgeschlossen, entweder daß

1) bei den Milzrupturen eine neue Piroplasmenart beteiligt ist oder daß

2) eine Mischinfektion von Piroplasmose mit einem anderen noch unbekannten Erreger vorliegt.

Naheliegende Beispiele dieser Art, die bei solchen Diagnosen zur Vorsicht mahnen, sind z. B. die Mischinfektionen von Texasfieber- und Küstenfieberparasiten, ferner von bösartigem Katarrhalfieber der Schafe und Schafpocken. In beiden Fällen wurde seinerzeit von den Tierärzten Südafrikas zunächst behauptet, daß es sich um eine perakute Form von Texasfieber bzw. Katarrhalfieber handele. Erst spätere genauere Untersuchungen haben ergeben, daß es sich in Wirklichkeit um zwei ganz verschiedene Parasiten bzw. Krankheiten gehandelt hat.

Diese Reserve, die ich mir schon bei der ersten Veröffentlichung vom 22. Juni in No. 25 der Berl. tierärztl. Wochenschr. auferlegt habe, ist von Herrn Miessner dahin gedeutet worden, daß Knuth und Meissner über die Art der dabei nachgewiesenen Blutparasiten vorläufig ein entscheidendes Urteil noch nicht abgeben wollen.

Wie aus der vorstehenden Ausführung ersichtlich, ist aber dieser Passus meiner Veröffentlichung ganz anders zu deuten.

Schließlich sei noch erwähnt, daß ich im November 1911 in mehreren Ortschaften des Kreises Apenrade, in denen während des Sommers Fälle von sogenannter Milzruptur beobachtet worden waren, eine bisher in Deutschland noch nicht nachgewiesene Zeckenart, nämlich *Haemaphysalis punctata*, bei Rindern und Schafen gefunden habe<sup>1)</sup>. Von dieser Zecke war bekannt, daß sie in England vorkommt und dort neben

1) Vgl. Berl. Tierärztl. Wochenschr. 1911. No. 48.

*Ixodes ricinus* die Rinderpiroplasmose überträgt (Nuttall). Es ist daher möglich, daß *Haemaphysalis punctata* auch im Kreise Apenrade dieselbe Eigenschaft besitzt. Ob die durch sie übertragenen Piroplasmen sich von den durch *Ixodes ricinus* übertragenen unterscheiden und ob erstere vielleicht leicht Milzrupturen veranlassen, muß erst noch näher geprüft werden.

*Nachdruck verboten.*

## Untersuchungen über die hämolytische Wirkung der Kolostralmilch der Kuh.

[Aus dem Institut für Seuchenlehre der K. Tierärztlichen Hochschule zu Stuttgart (Vorstand: Prof. Dr. Reinhardt).]

Von Dr. Wilhelm Köbele, Tierarzt in Ihringen (Baden).

### I. Einleitung und literarische Uebersicht.

Die Untersuchungen auf dem Gebiete der Hämolysen, über welche in den letzten Jahren, ausgehend von den Abhandlungen von Bordet (3), Ehrlich und Morgenroth (6), eine umfangreiche Literatur entstanden ist, beschäftigen sich in der überwiegenden Mehrzahl mit der hämolytischen Wirkung der Immunsere. Es ist das Verdienst Ehrlichs und Morgenroths, ihre Erfahrungen auch auf das Studium der normalen Serumhämolysen übertragen zu haben. Daß die normalen Sera vieler Tiere imstande sind, die roten Blutkörperchen fremder Tierarten aufzulösen, wissen wir schon aus den Untersuchungen von Creite (5), Panum (16) und Landois (10) über die Transfusion von Blut anderer Tierarten.

Die Zerstörung der roten Blutkörperchen, das „Lackfarbenwerden“ des Blutes, konnte Landois bereits im Jahre 1875 *in vitro* zeigen. Die Stoffe, die diesen Vorgang bewirken, bezeichnet man als „Hämolysine“. Es sind dies Stoffe ganz spezifischer Natur, die auch in dem Normalserum jeder Tierart in mehr oder weniger großer Menge vorhanden sind.

Im folgenden gebe ich eine kurze Uebersicht über die hämolytische Wirkung einzelner normaler Tiersera.

Schon Landois hatte gefunden, daß normales Pferdeserum fast gar keine hämolytische Wirkung auf die roten Blutkörperchen anderer Säugetiere ausübt; selbst 1 cm der sonst so leicht zerstörbaren Blutzellen vom Meerschweinchen zeigte erst bei Zusatz von 1,5 ccm Pferdeserum nach 20 Stunden vollendete Lackfarbe. Die gleiche Menge Kaninchenblut wird bei 0,5 ccm Serumzusatz komplett gelöst. Ebenso haben Morgenroth und Sachs (14) durch zahlreiche Untersuchungen gefunden, daß das normale Pferdeserum in der Regel nur geringe hämolytische Wirkung ausübt. Hammel-, Ochsen- und Gänseblut werden nach ihrer Kenntnis überhaupt nicht gelöst. Während gegenüber Kaninchen- und Meerschweinchenblut eine starke Variabilität besteht, indem manche Pferdesera eine nicht unbedeutende hämolytische Wirkung auf eine dieser Blutarten ausübten, sind andere dagegen wieder völlig unwirksam. Sie fanden sogar, daß die hämolytische Wirkung des Serums desselben Tieres wechseln kann.

Nach den von Buchner (4), Ehrlich und Sachs (7) mitgeteilten Befunden löst normales Rinderserum die Meerschweinchenblutkörperchen auf. Letzterer konnte auch eine Auflösung der Kaninchenblutkörperchen durch das normale Rinderserum feststellen. Diese Angaben bestätigte Stern (22), und zwar ist nach ihm die hämolytische Wirkung des Rinderserums auf Meerschweinchenblut sehr intensiv und fünfmal stärker als die auf Kaninchenblut. Nach Gürber (8) werden die Blutzellen vom

Kaninchen und Pferd durch das Rinderserum in  $\frac{1}{2}$ —1 Stunde vollständig aufgelöst; die roten Blutkörperchen vom Menschen dagegen werden erst nach Verlauf von 1 Stunde zerstört. Hammelblut ist nach 2 Tagen kaum aufgelöst; bei Schweineblutzellen tritt überhaupt keine Lösung ein.

Normales Hammelserum löst Meerschweinchenblutzellen. Nach Gürber werden die Blutkörperchen vom Menschen, Rind, Schwein und die der Taube durch normales Hammelserum nicht gelöst. Nach Sachs wird Meerschweinchenblut erst bei Zusatz von 0,5 ccm normalem Hammelserum vollständig gelöst.

Ehrlich, Morgenroth, Buchner und Lüdke (13) fanden die hämolytische Wirkung des normalen Kaninchenserums bei verschiedenen Tierarten verschieden stark ausgeprägt. Bisweilen bewirken erhöhte Dosen von Serum eine Spur von Lösung des Meerschweinchenblutes, in anderen Fällen wurde dagegen dasselbe durch geringe Serumquantitäten zur vollständigen Hämolyse gebracht. Landois, Rissling (18) und Lüdke fanden, daß normales Kaninchenserum die roten Blutkörperchen vom Meerschweinchen, Hammel und Menschen mehr oder weniger vollständig auflöst. Gürber dagegen konnte bei seinen Untersuchungen eine Hämolyse von Menschen-, Rinder-, Pferde-, Hammel- und Meerschweinchenblutkörperchen nicht feststellen.

Außer diesen natürlich vorhandenen, normalen Hämolytinen der normalen Tiersera können hochwertige Hämolytine künstlich noch dadurch erzeugt werden, daß man eine Tierart mit dem Blute einer anderen Tierart vorbehandelt. Es bilden sich dann in dem Serum der ersteren Tierart Stoffe, die nur diejenigen Blutkörperchen auflösen, die zu ihrer Erzeugung verwendet wurden.

Mit diesen letzteren Seris suchte man zuerst ein Komplement auch in der Milch nachzuweisen; später jedoch zeigte es sich, daß auch die normalen Sera von Ziege und Rind an Stelle von hämolytischen Sera zum Nachweis des Komplements genügten.

Bezüglich des Wesens der Hämolyse sei hervorgehoben, daß Bordet zuerst festgestellt hat, daß die Hämolyse auf die kombinierte Wirkung zweier Substanzen, einer thermostabilen und einer thermolabilen, zurückzuführen ist, und daß es namentlich Ehrlich ist, der die gemeinsame Wirkungsweise der beiden Substanzen zur Anschauung gebracht hat. Die thermostabile Substanz, den eigentlich spezifisch wirksamen Bestandteil, nennt er „Ambozeptor“; die thermolabile Substanz, den die Hämolyse auslösenden Bestandteil, „Komplement“, das dem Alexin Buchners entspricht. Dem Ambozeptor schreibt er 2 haptophore Gruppen zu, die eine hat eine große Affinität zu der entsprechenden haptophoren Gruppe der Zelle und verbindet sich mit ihr, die zweite, von geringerer Affinität, ist erst bei höherer Temperatur imstande, sich mit der thermolabilen Substanz, dem Komplement, zu binden.

Der Ambozeptor ist ziemlich resistent und verträgt relativ hohe Temperaturen. Während das Komplement schon durch Erwärmen auf 56° C seine Wirkung einbüßt, bleibt der Ambozeptor bei dieser Temperatur noch vollständig intakt.

Der Vorgang der Hämolyse besteht darin, daß die an die roten Blutkörperchen herantretenden Antikörper (Ambozeptor und Komplement) den Blutkörperchen, deren Stroma normalerweise als diffusionsverhindernde Membran undurchlässig ist, das Hämoglobin entziehen. Man erkennt die Hämolyse daran, daß die deckfarbene Aufschwemmung der roten Blutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung lackfarben wird. Diese Wirkung wird bekanntlich auch beim Einbringen von Blutkörperchen in eine nicht isotone Flüssigkeit, z. B. destilliertes Wasser, erzielt. Es besteht also die Hämolyse in einem Austritt des Hämoglobins aus den Blutzellen, während die Stromata als Schatten zurückbleiben.

Neuerdings wurde von verschiedenen Autoren behauptet, daß auch die Milch Komplement und teilweise hämolytischen Ambozeptor enthalte. Dadurch solle sie imstande sein, die roten Blutkörperchen gewisser Tierarten aufzulösen.

Pfaundler und Moro (17), sowie Lane-Clayton (11) haben als erste gezeigt, daß Kuhmilch Komplement enthalten soll, daß auch in der Ziegen- und Kaninchenmilch solches zu finden sei. Sie wiesen nach, daß Meerschweinchenerythrocyten und inaktiviertes Rinderserum mit frischer, roher Kuhmilch vollständige Hämolyse ergaben.

Weitere Untersuchungen dieser Art wurden von Bauer (1) vorgenommen. Ihm ist es nicht gelungen, bei Innehaltung der von Pfaundler und Moro angewandten Versuchstechnik in der Milch Komplement für das System inaktiviertes Rinderserum und Meerschweinchenblut zu finden. Spätere Untersuchungen, die er gemeinschaftlich mit Kopf (9) vornahm, waren ebenso resultatlos. Die beiden ersteren Autoren verteidigten daraufhin ihre positiven Befunde. In einer vorgenommenen Demonstration gelang es ihnen, in 6 Milchen Komplement für das in Frage stehende System nach-

zuweisen. Die Hämolysen war in allen Fällen deutlich von wechselnder und nirgends hoher Intensität; denn obwohl sie eine relativ große Milchmenge (1 ccm bzw. 0,75 ccm) bei ihrer Methode verwendeten, kam es nirgends zur kompletten Lösung der Erythrocyten. Ueberall konnte nur eine Spur von Hämolysen bei Verwendung von 1 ccm einer 5-proz. Meerschweinchenblutaufschwemmung beobachtet werden. Desgleichen fanden Pfaundler und Moro auch in der Kolostralmilch der Frauen Komplement.

Noeggerath und Kolff (15) untersuchten in mehrfacher Wiederholung aus verschiedenen Stillperioden stammende Milchproben und am 0.—2. Tage gewonnene Kolostren von 30 Frauen auf Komplement. Durch diese Frauenmilchproben wurde in der Mehrzahl der Fälle das Blut vom Meerschweinchen, Kaninchen, Hammel, Huhn und Pferd nicht gelöst. Wo eine Hämolysen eintrat, sagt Noeggerath, war sie gering. Auch bei Verwendung normaler vom Rind und Menschen stammender inaktivierter Sera, sowie vom Kaninchen, der Ziege und dem Menschen herrührender, vorbehandelter Sera änderte sich das Bild nicht. Es gelang ihnen nicht, bei Zuhilfenahme möglichst geeigneter, hochwertiger Sera mit 5 Ammenmilchen und 4 Kolostren Hämolysen zu erzeugen; es war somit kein Komplement enthalten.

Als Erklärung für das Mißlingen des Nachweises von Komplement in seinen und Bauers Untersuchungen führt Noeggerath die Qualität des verwendeten Serums an. Moro hatte empirisch gefunden, daß der Versuch nur mit manchen Seris, nach denen er hat lange suchen müssen, gelingt. Noeggerath und Bauer konnten mit einem solchen Serum in derselben, auch von Pfaundler und Moro untersuchten Milch alle Uebergänge von fehlerhafter bis zu deutlicher Hämolysen erzielen. Sie sind der Ansicht, daß der Komplementgehalt dieser Milchen sehr gering war, und daß der Nachweis dieser geringen Komplementmenge nur dann gelingt, wenn das zu den Versuchen verwendete Serum besonders günstige Verhältnisse zur Bindungsfähigkeit mit dem gesuchten Milchkomplement aufweist.

Von der Erwägung ausgehend, daß im Kolostrum gegenüber der Spätmilch morphologische Bestandteile des Blutserums vorhanden sind, untersuchten Bauer und Kopf (9), ob nicht auch im Kuhkolostrum hämolysische Substanzen vom Charakter des im Rinderserum vorhandenen Komplements und Ambozeptors vorkämen. Als Objekt der Hämolysen wählten sie Meerschweinchenerythrocyten. Sie fanden, daß ganz junges Kolostrum der ersten Tage die Fähigkeit hat, Meerschweinchenblut zu lösen. Dies hält gewöhnlich bis zum 3. Tage an. Von diesem Tage ab schwindet der hämolysische Ambozeptor, während sie Komplement auch späterhin, und zwar bis zum 14. Tage und darüber wenigstens in kleinen Mengen dadurch nachweisen konnten, daß sie zu der Kolostralmilch inaktiviertes, also ambozeptorhaltiges Normal-Rinderserum zusetzten.

Sassenhagen (21) setzte die Versuche Kopfs mit Kolostrum von Kühen und Ziegen fort und fand ebenfalls hämolysischen Ambozeptor, der schon wenige Tage nach der Geburt aus dem Kolostrum schwand, und Komplement, das sich bei Anwendung eines vorbehandelten Serums bis zum 27. Tage post partum nachweisen ließ. Bei den Kontrollversuchen, die Sassenhagen mit gewöhnlicher Milch vornahm, fand er eines Tages auch in einer solchen Milch Komplement. 18 Tage später stellte sich bei dieser Kuh klinisch eine Euterentzündung ein (Mastitis apostematosa staphylococcica); ein Zusammenhang zwischen dem Komplementgehalt dieser Milch und der späteren Euterentzündung dürfte wohl kaum bestehen, da die Inkubationszeit bei Mastitis bekanntlich sehr kurz ist. Bei 41 von ihm untersuchten Milchproben euterkranker Kühe konnte er stets Komplement nachweisen. Er kommt zu dem Schlusse, daß die Hämolysen ein gutes Mittel ist, euterkranken Tiere von solchen mit gesundem Euter zu unterscheiden, selbst dann, wenn die Krankheit so wenig ausgeprägt ist, daß klinisch noch keine Diagnose gestellt werden kann.

Lenzen (12), der auch Versuche in dieser Richtung mit Mastitismilch vornahm, konnte die Angaben Sassenhagens bestätigen. In allen untersuchten Mastitismilchen gelang ihm der Nachweis von Komplement. Als Objekt der Hämolysen nahm er nebeneinander eine 5-proz. Aufschwemmung von Meerschweinchenblut und eine solche von Kaninchenblut in physiologischer Kochsalzlösung.

Zu seinen ersten Versuchen verwendete Sassenhagen ein mit Meerschweinchenblut vorbehandeltes inaktiviertes Serum und eine 5-proz. Meerschweinchenerythrocyten-Aufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung. Die Kolostralmilch stammte von einer Ziege und einer Kuh. In beiden Fällen konnte er noch bei Verwendung einer sehr geringen Menge aktiven Kolostrums (0,1 ccm) in den allerersten Tagen post partum eine Spur von Hämolysen nachweisen; die Wirkung des Kolostrums nahm jedoch von Tag zu Tag ab, bis zuletzt selbst bei Verwendung von 1 ccm Milch am 27. Tage nach der Geburt nur noch eine Spur von Lösung vorhanden war. Sassenhagen fand, daß auch inaktiviertes normales, nicht vorbehandeltes Rinder- und Ziegenserum bei Zusatz von Kolostralmilch Meerschweinchenblut auflöst. In zwei Fällen, und zwar in

einem Ziegen- und einem Kuhkolostrum, konnte er mit diesen normalen Sera Komplement bis zum 18. bzw. 19. Tage nach der Geburt nachweisen.

Kopf prüfte in seinen ersten Untersuchungen die Versuche von Lane-Claypon nach. Sie weichen im Grunde genommen nur in den Mengenverhältnissen der einzelnen Komponenten um wenig von der von Pfaundler und Moro angewandten Technik ab. Er verwendet 0,4 ccm einer 5-proz. Meerschweinchenblutaufschwemmung und 0,2 ccm inaktiviertes Rinder Serum. Auf diese Art gelang ihm der Nachweis von Komplement in normaler Milch nicht; in der Kolostralmilch jedoch konnte er bis zum 3. Tage einen hämolytischen Ambozeptor und bis zum 17. Tage Komplement feststellen.

## II. Versuchstechnik.

Nach einer neueren Mitteilung in der Berlin. tierärztl. Wochenschr. Jahrg. 1911. No. 8 empfehlen Sassenhagen und Bauer (2) an Stelle einer 5-proz. Meerschweinchenblutaufschwemmung eine 1-proz. Aufschwemmung von Kaninchenblut in physiologischer Kochsalzlösung zu den Versuchen zu verwenden. Nach ihren Angaben sollen die Versuche folgendermaßen angestellt werden. Es kommen 3 Gestelle mit je 7 Gläsern zur Verwendung. Die Milch wird durch Zentrifugieren entrahmt. Die Magermilch wird in die Röhrchen des Gestelles No. I, wie folgt, verteilt. In Röhrchen 1 wird 1 ccm Milch gebracht, in Röhrchen 2 0,75 ccm, in Röhrchen 3 0,5 ccm, in Röhrchen 4 0,25 ccm, in Röhrchen 5 0,15 ccm, in Röhrchen 6 0,1 ccm, in Röhrchen 7 0,0 ccm. Sämtliche Röhrchen werden mit 0,85-proz. Kochsalzlösung auf die Höhe des ersten Röhrchens aufgefüllt. In jedes Röhrchen werden alsdann 0,2 ccm eines inaktivierten Rinder Serums gegeben, und zum Schlusse wird 1 ccm 1-proz. Kaninchenerythrocytenaufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung zugefügt.

Die Röhrchen des Gestelles No. II werden mit demselben Inhalte beschickt, nur kommt statt aktiver, inaktivierte Milch zur Verwendung.

Bei Gestell No. III stammt die zu prüfende Milch von einer gesunden altmilchenden Kuh.

Die Röhrchen werden einzeln durchgeschüttelt, damit sich die Flüssigkeiten ordentlich mischen. Dann kommen die Gestelle 2 Stunden in den Brutschrank von 37° C. Während dieser Zeit werden die Röhrchen öfters umgeschüttelt. Nach Ablauf von 2 Stunden werden die Gestelle an einen kühlen Ort bzw. in den Eisschrank gebracht, damit sich die intakt gebliebenen Blutkörperchen absetzen können. Die eingetretene Hämolyse ist an der diffusen Rotfärbung des Inhalts erkennbar. In denjenigen Röhrchen von Gestell II und III, die Milch enthalten, darf keine Hämolyse eintreten, da sonst die zur Verwendung gelangten Flüssigkeiten nicht einwandfrei beschaffen sind. Das Inaktivieren der Milch und des Serums geschieht durch Erwärmen im Wasserbade von 56° C während einer halben Stunde.

## III. Eigene Untersuchungen zwecks Nachweises eines hämolytischen Ambozeptors und Komplements in der Kolostralmilch.

Bei meinen Versuchen bin ich genau den Anordnungen von Bauer und Sassenhagen gefolgt. Jedoch verwendete ich zu meinen Versuchen in jedem Gestell 2 weitere Kontrollen. In Röhrchen 8 überzeugte ich mich von der Vollwertigkeit meines Serums, indem ich hier aktives Serum mit Kaninchenerythrocyten zusammenbrachte. Röhrchen 9 enthielt aktive, bzw. inaktivierte, bzw. normale Milch und 1 ccm derselben

Kaninchenblutaufschwemmung, um feststellen zu können, ob Kolostralmilch für sich allein imstande ist, rote Blutkörperchen aufzulösen. Die Anordnung ist aus folgendem Schema ersichtlich.

Röhrchen	Milch	0,85-proz. Kochsalzlösung	Inaktiviertes Rinderserum	1-proz. Kaninchen- erythrocyten- aufschwemmung
1	1,0	—	0,2	1,0
2	0,75	0,25	0,2	1,0
3	0,5	0,5	0,2	1,0
4	0,25	0,75	0,2	1,0
5	0,15	0,85	0,2	1,0
6	0,1	0,9	0,2	1,0
7	—	1,0	0,2 aktives Rinderserum	1,0
8	—	1,0	0,2	1,0
9	1,0	—	—	1,0

Zur Untersuchung gelangte die Kolostralmilch von 16 Kühen. Die Kühe standen zum größten Teil in der Gebärdklinik der Königl. Tierärztlichen Hochschule zu Stuttgart. Außerdem untersuchte ich die Kolostralmilch von Kühen, die in der Umgebung von Stuttgart geboren hatten, wodurch es mir möglich war, die Kühe selbst auf ihren Gesundheitszustand zu untersuchen. In jedem Falle orientierte ich mich über den Verlauf der Geburt, der bei allen Tieren normal war. Bei keinem der Tiere, außer bei Kuh No. V, die während 2 Tage geringgradiges Fieber hatte, war eine innere oder äußere Erkrankung, speziell eine solche des Euters, nachzuweisen. Kuh No. I, V und VII hatten Euterödeme, die aber am 3. bzw. 4. Tage nach der Geburt wieder verschwunden waren.

Meine Kontrollen nahm ich mit Milch von gesunden Kühen vor, die vor 3—12 Monaten gekalbt hatten; auch diese Kühe wurden von mir selbst auf ihren Gesundheitszustand untersucht.

Die Milch wurde zwar nicht steril, aber auf möglichst saubere Art und Weise entnommen. Das Euter wurde abgewaschen und mit einem frisch gewaschenen Handtuch abgetrocknet. Die ersten 3 Strahlen wurden beiseite gemolken; darauf wurde die Milch in ein steriles Gefäß aufgefangen.

Die zur Untersuchung gelangte Milch war gewöhnlich Endmilch, d. h. Milch, die nach dem Saugen des Kalbes im Euter noch vorhanden war, nebenbei legte ich auch Wert darauf, Untersuchungen mit Anfangsmilch (der vor dem Saugen des Kalbes gewonnenen Milch) anzustellen, um zu prüfen, ob zwischen Anfangs- und Endmilch ein Unterschied bezüglich ihrer hämolytischen Kraft besteht. Bei Kuh No. III und V untersuchte ich während 2 Tagen die Anfangs- und Endmilch derselben Melkzeit, um festzustellen, ob etwa das Melken einen Einfluß auf das Vorkommen von Komplement hätte. Die Untersuchungen wurden unmittelbar im Anschluß an das Kalben täglich, von der zweiten Woche post partum ab jeden 2 bzw. 3. Tag vorgenommen, und zwar in den meisten Fällen 1—4 Stunden nach der Milchentnahme. Zwei Milchproben wurden direkt im Anschluß an die Geburt untersucht. Kuh No. I war mir erst am 3. Tage nach dem Kalben zur Milchentnahme zugänglich. Die Proben von Kuh No. II, IV und VI konnte ich ebenfalls erst vom 2. Tage post partum ab untersuchen.



Zu allen Untersuchungen verwendete ich ausschließlich Rinderserum. Daneben stellte ich Versuche in der Richtung an, ob das Rinderserum nicht durch das Serum einer anderen Tierart zu ersetzen wäre. In Anwendung gelangten Pferde-, Ziegen- und Hammelserum.

Weiterhin stellte ich Versuche dahin an, ob das Komplement in der Milch ein spezifisches sei, oder ein Komplement wie dasjenige im Meer-schweinchenblut, das zu den gewöhnlichen hämolytischen Versuchen verwendet wird.

Außerdem habe ich nachgeprüft, ob in der Milch ein hämolytischer Ambozeptor vorhanden, und wie lange derselbe post partum nachzuweisen sei.

Das bei den Versuchen zur Verwendung gekommene Serum wurde von Rindern, die im Stuttgarter Schlachthaus geschlachtet wurden, gewonnen. Nachdem bei den Tieren der Bruststich ausgeführt war, wurde das Blut in einem sterilen Glaszylinder aufgefangen und an einem kühlen Ort aufbewahrt. Am nächsten Tag war reichlich Serum ausgepreßt. Das Serum wurde abpipettiert, und da es noch etwas Blut enthielt, zentrifugiert, wodurch ein vollständig klares Serum erhalten wurde. Das so gewonnene Serum wurde höchstens 4 Tage lang zu den Versuchen verwendet; während dieser Zeit blieb es immer vollständig klar.

Das Pferde-, Ziegen- und Hammelserum wurde auf sterile Weise durch Aderlaß gewonnen.

Das Kaninchenblut gewann ich durch Anschneiden der Ohrvene nach vorheriger Reinigung der Haut. Das abtropfende Blut wurde in einer sterilen Porzellanschale aufgefangen und sofort mit einem Glasstab geschlagen. Sodann wurde es filtriert und die Blutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung 4—5mal gewaschen. Daraus wurde eine 1-proz. Blutkörperaufschwemmung in physiologischer (0,85-proz.) Kochsalzlösung hergestellt. Diese Aufschwemmung wurde nur so lange verwendet, als die bei längerem Stehen über den Blutkörperchen stehende Flüssigkeit farblos war. Hatte sie nur den geringsten rötlichen Ton angenommen, so wurde die Lösung erneuert. Dies geschah gewöhnlich jeden 2., spätestens 3. Tag.

Das Untersuchungsergebnis wurde von mir frühestens 15 Stunden nach der Herausnahme der Gestelle aus dem Brutschrank festgestellt.

Die Ablesung geschah dermaßen, daß ich folgende Werte aufstellte:

1) Komplette Hämolyse, wenn der Inhalt der Röhrchen gleichmäßig rot gefärbt war und auf dem Boden keine roten Blutkörperchen mehr, sondern nur die farblosen Stromata der Blutzellen als Bodensatz sichtbar waren.

2) Mäßige Hämolyse, wenn der Inhalt rot gefärbt war und noch ein Teil der roten Blutkörperchen als Bodensatz übrig blieb.

3) Spur von Hämolyse, wenn der Inhalt einen rötlichen Ton angenommen hatte und der größte Teil der roten Blutkörperchen als Bodensatz noch vorhanden war.

4) Keine Hämolyse, wenn der Inhalt der Röhrchen eine weiße bzw. gelbe Farbe hatte, und sämtliche roten Blutkörperchen am Boden saßen.

Wie bereits aus der Besprechung der Technik hervorgeht, wurden immer 0,2 ccm aktives und inaktiviertes Rinderserum und 1 ccm einer 1-proz. Aufschwemmung von Kaninchenerythrocyten in physiologischer Kochsalzlösung zu den Versuchen verwendet.

Die Grade der eingetretenen Hämolysen bezeichne ich mit folgenden Buchstaben:

k. H. = komplette Hämolysen,  
m. H. = mäßige Hämolysen,  
Sp. = Spur von Hämolysen,  
0 = keine Hämolysen.

Meine Untersuchungen habe ich in folgenden Tabellen zusammengefaßt:

Nähere Bezeichnung des Tieres	Tag der Untersuchung post partum	Menge des zugefügten aktiven Kolostrums	Grad der Hämolysen	Bemerkungen
Kuh No. I, Gelbfleck, S. K., ca. 6 J. alt, normale Geburt am 14. Mai 11, Ausstoßung der Nachgeburt rechtzeitig. Allgemeinbefinden gut. Kalb saugt.	3.	1,0	0	Leichtes Euterödem.
		0,75	0	Kontrollen mit inaktivierter Kolostralmilch und Milch einer altmilchenden Kuh waren negativ.
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	4.	1,0	0	Euterödem nicht mehr vorhanden.
		0,75	0	
		0,5	0	Kontrollen negativ.
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	5.	1,0	0	
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	Kontrollen negativ.
		0,15	0	
		0,1	0	
	6.	1,0	0	
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	Kontrollen negativ.
		0,15	0	
		0,1	0	
	9.	1,0	0	
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	Kontrollen negativ.
		0,15	0	
		0,1	0	
	12.	1,0	0	
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	Kontrollen negativ.
		0,15	0	
		0,1	0	
Kuh No. II, Gelbscheck, S. K., ca. 10 J. alt, normale Geburt am 17. Mai. Nachgeburt rechtzeitig ausgestoßen. Allgemeinbefinden gut. Kalb saugt.	2.	1,0	0	
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	Kontrollen negativ.
		0,15	0	
		0,1	0	

Nähere Bezeichnung des Tieres	Tag der Untersuchung post partum	Menge des zugefügten aktiven Kolostrums	Grad der Hämolyse	Bemerkungen
	3.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	5.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	7.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	10.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	14.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
Kuh No. III, Gelbscheck, S. K., ca. 9 Jahre alt. Normale Geburt am 23. Mai. Nachgeburt wurde rechtzeitig ausgestoßen. Allgemeinbefinden gut. Kalb saugt.	3. Stunde	1,0	k. H.	Kontrollen negativ. 1 ccm der aktiven Kolostralmilch löste bei dieser Untersuchung 1 ccm der 1-proz. Kaninchenblutaufschwemmung ohne Zusatz von Rinderserum. Es ist mäßige Hämolyse eingetreten.
		0,75	k. H.	
		0,5	m. H.	
		0,25	Sp.	
		0,15	0	
		0,1	0	
	1.	1,0	k. H.	Kontrollen negativ. In Röhrchen 9 (ohne Zusatz von Rinderser.) m. H.
		0,75	k. H.	
		0,5	m. H.	
		0,25	Sp.	
		0,15	0	
		0,1	0	
	2.	1,0	k. H.	Kontrollen negativ.
		0,75	m. H.	
		0,5	Sp.	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	3.	1,0	k. H.	Kontrollen negativ.
		0,75	m. H.	
		0,5	Sp.	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	

Nähere Bezeichnung des Tieres	Tag der Untersuchung post partum	Menge des zugefügten aktiven Kolostrums	Grad der Hämolyse	Bemerkungen
	4.	1,0	m. H.	Diese Milchprobe wurde vor dem Saugen des Kalbes (Anfangsmilch) entnommen. Kontrollen negativ.
		0,75	Sp.	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	4.	1,0	m. H.	Entnahme der Probe nach dem Saugen des Kalbes (Restmilch).
		0,75	Sp.	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	5.	1,0	m. H.	Entnahme der Probe vor dem Saugen des Kalbes. Kontrollen negativ.
		0,75	Sp.	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	5.	1,0	m. H.	Entnahme dieser Probe nach dem Saugen des Kalbes.
		0,75	Sp.	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	6.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	8.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	11.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
Kuh No. IV, Allgäuer Rasse, ca. 7 J. alt. Normale Geburt am 24. Mai. Nachgeburt rechtzeitig ausgestoßen. Allgemeinbefinden gut. Kalb saugt.	2.	1,0	Sp.	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	3.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	

Nähere Bezeichnung des Tieres	Tag der Untersuchung post partum	Menge des zugefügten aktiven Kolostrums	Grad der Hämolyse	Bemerkungen
	4.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	5.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	7.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	9.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	11.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
Kuh No. V, Rotscheck, S. K., ca. 4 J. alt. Normale Geburt am 25. Mai. Nachgeburt rechtzeitig ausgestoßen. Allgemeinbefinden gut. Kalb saugt.	2.	1,0	m. H.	Starkes Euterödem.
		0,75	Sp.	Kontrollen negativ.
		0,5	Sp.	In Röhrchen 9 (aktive Kolostralmilch und 1 ccm 1-proz. Kaninchenblut-aufschwemmung) ist mäßige Hämolyse eingetreten.
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	3.	1,0	Sp.	Kontrollen negativ.
		0,75	Sp.	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	4.	1,0	0	Euterödem verschwunden.
		0,75	0	Temperatur 39,8.
		0,5	0	Futter- und Getränkeaufnahme gut.
		0,25	0	Kontrollen negativ.
		0,15	0	
		0,1	0	
	5.	1,0	0	Temperatur 39,2.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	



Nähere Bezeichnung des Tieres	Tag der Untersuchung post partum	Menge des zugefügten aktiven Kolostrums	Grad der Hämolyse	Bemerkungen
	6.	1,0	0	Temperatur 38,8.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	Kontrollen negativ.
		0,15	0	
		0,1	0	
	7.	1,0	0	Entnahme der Probe vor dem Saugen des Kalbes.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	Kontrollen negativ.
		0,15	0	
		0,1	0	
	7.	1,0	0	Entnahme der Probe nach dem Saugen des Kalbes.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	9.	1,0	0	Entnahme der Probe vor dem Saugen des Kalbes.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	Kontrollen negativ.
		0,15	0	
		0,1	0	
	9.	1,0	0	Entnahme der Probe nach dem Saugen des Kalbes.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
K u h N o. V I, Gelbscheck, S. K., ca. 12 J. alt. Normale Geburt am 26. Mai. Ausstoßung der Nachgeburt rechtzeitig. Allgemeinbefinden gut. Kalb saugt.	1.	1,0	k. H.	In dem mit 1 ccm aktiver Kolostralmilch und 1 ccm der 1-proz. Kaninchenblutkörperchenaufschwemmung beschickten Röhrchen 9 ist mäßige Hämolyse eingetreten. Kontrollen negativ.
		0,75	k. H.	
		0,5	m. H.	
		0,25	Sp.	
		0,15	0	
		0,1	0	
	2.	1,0	k. H.	Kontrollen negativ.
		0,75	m. H.	
		0,5	Sp.	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	3.	1,0	m. H.	Kontrollen negativ.
		0,75	Sp.	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	4.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	



Nähere Bezeichnung des Tieres	Tag der Untersuchung post partum	Menge des zugefügten aktiven Kolostrums	Grad der Hämolyse	Bemerkungen
	5.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	7.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	10.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
Kuh No. VII, Gelbscheck, S. K., ca. 2 J. alt. Normale Geburt am 31. Mai. Nachgeburt rechtzeitig ausgestoßen. Allgemeinbefinden gut. Kalb saugt.	1.	1,0	k. H.	1 ccm dieser aktiven Kolostralmilch löste 1 ccm der 1-proz. Kaninchenerythrocytenaufschwemmung komplett auf. Kontrollen negativ.
		0,75	m. H.	
		0,5	m. H.	
		0,25	Sp.	
		0,15	0	
		0,1	0	
	2.	1,0	k. H.	In Röhrchen 9 d. Gestelles No. I ist noch Spur von Hämolyse vorhanden. Kontrollen negativ.
		0,75	m. H.	
		0,5	Sp.	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	3.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	4.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	5.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	7.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	

Nähere Bezeichnung des Tieres	Tag der Untersuchung post partum	Menge des zugefügten aktiven Kolostrums	Grad der Hämolyse	Bemerkungen
	9.	1,0 0,75 0,5 0,25 0,15 0,1	0 0 0 0 0 0	Kontrollen negativ.
Kuh No. VIII, Falb, S. K., ca. 7 J. alt. Normale Geburt am 1. Juni. Ausstoßung d. Nachgeburt rechtzeitig. Allgemeinbefinden gut. Kalb saugt.	1.	1,0 0,75 0,5 0,25 0,15 0,1	k. H. m. H. Sp. Sp. 0 0	Leichtes Euterödem. Kontrollen negativ.
	2.	1,0 0,75 0,5 0,25 0,15 0,1	k. H. m. H. Sp. 0 0 0	Kontrollen negativ.
	3.	1,0 0,75 0,5 0,25 0,15 0,1	Sp. 0 0 0 0 0	Euterödem verschwunden. Kontrollen negativ.
	4.	1,0 0,75 0,5 0,25 0,15 0,1	0 0 0 0 0 0	Kontrollen negativ.
	5.	1,0 0,75 0,5 0,25 0,15 0,1	0 0 0 0 0 0	Kontrollen negativ.
	8.	1,0 0,75 0,5 0,25 0,15 0,1	0 0 0 0 0 0	Kontrollen negativ.
	10.	1,0 0,75 0,5 0,25 0,15 0,1	0 0 0 0 0 0	Kontrollen negativ.
	1.	1,0 0,75 0,5 0,25 0,15 0,1	m. H. Sp. 0 0 0 0	Kuh wird gemolken. Kontrollen negativ.

Nähere Bezeichnung des Tieres	Tag der Untersuchung post partum	Menge des zugefügten aktiven Kolostrums	Grad der Hämolyse	Bemerkungen
	2.	1,0	m. H.	Kontrollen negativ.
		0,75	Sp.	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	3.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	4.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	6.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	8.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	11.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
Kuh No. X, Rotscheck, S. K., ca. 5 J. alt. Normale Geburt am 1. Juni. Nachgeburt rechtzeitig ausgestoßen. Allgemeinbefinden gut. Kalb saugt.	1.	1,0	k. H.	Kontrollen negativ.
		0,75	m. H.	
		0,5	Sp.	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	2.	1,0	m. H.	Kontrollen negativ.
		0,75	Sp.	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	3.	1,0	Sp.	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	

Nähere Bezeichnung des Tieres	Tag der Untersuchung post partum	Menge des zugefügten aktiven Kolostrums	Grad der Hämolyse	Bemerkungen
	4.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	5.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	7.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	9.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
Kuh No. XI, Rotscheck, S. K., ca. 4 J. alt. Normale Geburt am 4. Juni. Ausstoßung der Nachgeburt rechtzeitig. Allgemeinbefinden gut. Kalb saugt.	1.	1,0	k. H.	Die aktive Kolostralmilch in Röhrchen 9 löste 1 ccm der 1-proz. Kaninchenblutaufschwemmung komplett auf. Kontrollen negativ.
		0,75	k. H.	
		0,5	m. H.	
		0,25	Sp.	
		0,15	0	
		0,1	0	
	2.	1,0	m. H.	In Röhrchen 9 ist noch eine Spur von Hämolyse eingetreten. Kontrollen negativ.
		0,75	Sp.	
		0,5	Sp.	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	3.	1,0	Sp.	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	4.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	5.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	



Nähere Bezeichnung des Tieres	Tag der Untersuchung post partum	Menge des zugefügten aktiven Kolostrums	Grad der Hämolyse	Bemerkungen
	6.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	7.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	10.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
Kuh No. XII, Allgäuer Rasse, ca. 3 J. alt. Normale Geburt am 8. Juni. Ausstoßung der Nachgeburt rechtzeitig. Allgemeinbefinden gut. Kalb saugt.	1.	1,0	m. H.	Kontrollen negativ.
		0,75	m. H.	
		0,5	Sp.	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	2.	1,0	Sp.	Kontrollen negativ.
		0,75	Sp.	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	3.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	4.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	6.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	9.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	

Nähere Bezeichnung des Tieres	Tag der Untersuchung post partum	Menge des zugefügten aktiven Kolostrums	Grad der Hämolyse	Bemerkungen
Kuh No. XIII, Falb, S. K., ca. 7 J. alt. Normale Geburt am 12. Juni. Ausstoßung der Nachgeburt rechtzeitig. Allgemeinbefinden gut. Kalb saugt.	1.	1,0	m. H.	Kontrollen negativ.
		0,75	Sp.	
		0,5	Sp.	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	2.	1,0	Sp.	Kontrollen negativ.
		0,75	Sp.	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	3.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	4.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	6.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	9.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	11.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
Kuh No. XIV, Kalbin, Weißscheck, ca. 2 J. alt. Normale Geburt am 15. Juni. Ausstoßung der Nachgeburt rechtzeitig. Allgemeinbefinden gut. Kalb saugt.	1.	1,0	k. H.	Kontrollen negativ.
		0,75	k. H.	
		0,5	m. H.	
		0,25	Sp.	
		0,15	0	
		0,1	0	
	2.	1,0	k. H.	Kontrollen negativ.
		0,75	m. H.	
		0,5	Sp.	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	



Nähere Bezeichnung des Tieres	Tag der Untersuchung post partum	Menge des zugefügten aktiven Kolostrums	Grad der Hämolyse	Bemerkungen
	3.	1,0	Sp.	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	4.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	5.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	7.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	10.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
Kuh No. XV, Kalbin, Leintaler Rasse, ca. 3 J. alt. Normale Geburt am 18. Juni. Nachgeburt rechtzeitig ausgestoßen. Allgemeinbefinden gut. Kalb saugt.	1.	1,0	k. H.	Kontrollen negativ.
		0,75	k. H.	
		0,5	m. H.	
		0,25	Sp.	
		0,15	0	
		0,1	0	
	2.	1,0	m. H.	Kontrollen negativ.
		0,75	Sp.	
		0,5	Sp.	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	3.	1,0	m. H.	Kontrollen negativ.
		0,75	Sp.	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	4.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	

Nähere Bezeichnung des Tieres	Tag der Untersuchung post partum	Menge des zugefügten aktiven Kolostrums	Grad der Hämolyse	Bemerkungen
	5.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	6.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	8.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	10.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
Kuh No. XVI, Gelbbläb, S. K., ca. 4 J. alt. Normale Geburt am 21. Juni. Ausstoßung der Nachgeburt rechtzeitig. Allgemeinbefinden gut. Kalb saugt.	1 Stunde	1,0	k. H.	1 ccm der aktiven Kolostralmilch löste 1 ccm der 1-proz. Kaninchenblutaufschwemmung komplett auf. Kontrollen negativ.
		0,75	m. H.	
		0,5	m. H.	
		0,25	Sp.	
		0,15	0	
		0,1	0	
	1.	1,0	k. H.	1 ccm der aktiven Kolostralmilch löst 1 ccm der 1-proz. Kaninchenblutaufschwemmung komplett auf. Kontrollen negativ.
		0,75	m. H.	
		0,5	m. H.	
		0,25	Sp.	
		0,15	0	
		0,1	0	
	2.	1,0	k. H.	In Röhrchen 9 d. Gestelles I ist Spur von Hämolyse vorhanden. Kontrollen negativ.
		0,75	m. H.	
		0,5	Sp.	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	3.	1,0	Sp.	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
	4.	1,0	0	Kontrollen negativ.
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	

Nähere Bezeichnung des Tieres	Tag der Untersuchung post partum	Menge des zugefügten aktiven Kolostrums	Grad der Hämolyse	Bemerkungen
	5.	1,0 0,75 0,5 0,25 0,15 0,1	0 0 0 0 0 0	Kontrollen negativ.
	7.	1,0 0,75 0,5 0,25 0,15 0,1	0 0 0 0 0 0	Kontrollen negativ.
	9.	1,0 0,75 0,5 0,25 0,15 0,1	0 0 0 0 0 0	Kontrollen negativ.

#### IV. Untersuchungen zur Prüfung der hämolytischen Wirkung einzelner normaler Tiersera auf Kaninchenblutkörperchen.

Im Nachstehenden lasse ich einige Untersuchungen folgen, die Aufschluß geben sollen, ob bei der Untersuchung von Kolostralmilch einer bestimmten Tierart auf ihre hämolytische Wirkung das Serum derselben Tierart zu verwenden sei, oder ob es auch durch Sera anderer Tierarten ersetzt werden könne. Zuerst prüfte ich die hämolytische Wirkung des normalen Pferdeserums auf die roten Kaninchenblutkörperchen. Die Menge des zur Untersuchung verwendeten Pferdeserums und der Grad der eingetretenen Hämolyse ist aus der Tabelle ersichtlich.

Röhrchen	Aktives Pferdeserum	1-proz. Kaninchenblut-aufschwemmung	Grad der eingetretenen Hämolyse
1	1,0	1,0	0
2	0,75	1,0	0
3	0,5	1,0	0
4	0,25	1,0	0
5	0,2	1,0	0

Das Gestell kam 2 Stunden in den Brutschrank bei 37° C. Bei der Ablesung nach 18 Stunden war in keinem der Röhrchen Hämolyse eingetreten. Das Pferdeserum ist somit nicht imstande, selbst bei Verwendung von relativ großen Mengen, die roten Blutkörperchen des Kaninchens aufzulösen.

Zur Feststellung, ob 0,2 ccm Rinderserum genügen, um eine vollständige Auflösung der roten Kaninchenblutkörperchen zu erzielen, brachte ich verschiedene Mengen normalen Rinderserums mit 1 ccm einer 1-proz. Kaninchenblutaufschwemmung zusammen. Diese Mischung kam ebenfalls 2 Stunden in den Brutschrank bei 37° C. Es zeigte sich, daß 0,2 ccm des Rinderserums die geringste Menge darstellt, die 1 ccm der 1-proz. Kaninchenblutaufschwemmung noch komplett löst. Siehe Tabelle.

Röhrchen	Aktives Rinderserum	1-proz. Kaninchenblut-aufschwemmung	Grad der Hämolyse
1	0,2	1,0	k. H.
2	0,1	1,0	m. H.
3	0,05	1,0	Sp.
4	0,01	1,0	0
5	0,005	1,0	0
6	0,001	1,0	0

Die hämolytische Wirkung des normalen Ziegenserums auf Kaninchenblutkörperchen untersuchte ich dadurch, daß ich 0,2 ccm Ziegenserum in fallenden Mengen auf 1 ccm einer 1-proz. Kaninchenblutkörperchen-Aufschwemmung einwirken ließ. Das Resultat der Untersuchung zeigt die folgende Tabelle.

Röhrchen	Aktives Ziegenserum	1-proz. Kaninchenblut-aufschwemmung	Grad der Hämolyse
1	0,2	1,0	k. H.
2	0,1	1,0	k. H.
3	0,05	1,0	k. H.
4	0,01	1,0	m. H.
5	0,005	1,0	Sp.
6	0,001	1,0	0

Die hämolytische Wirkung des Ziegenserums auf die roten Kaninchenblutkörperchen ist sehr intensiv; selbst 0,05 ccm vermögen noch eine vollständige, 0,005 ccm noch eine mäßige Hämolyse zu bewirken.

Die hämolytische Wirkung des Ziegenserums auf die Kaninchenblutkörperchen benutzte ich auch bei den Untersuchungen der Kolostralmilch auf ihren Komplementgehalt.

Nebeneinander untersuchte ich die Kolostralmilch der Kuh III an den gleichen Tagen bei Verwendung von Rinder- und Ziegenserum. Es zeigte sich bei den Ergebnissen kein Unterschied zwischen Rinder- und Ziegenserum. Wie folgende Tabelle zeigt, stimmten an allen Untersuchungstagen die Resultate vollständig überein.

Tag der Untersuchung post partum	Menge des zugefügten Kolostrums	Grad der Hämolyse bei Verwendung von inaktiviertem Rinderserum	Grad der Hämolyse bei Verwendung von inaktiviertem Ziegenserum
3 Stunden	1,0 0,75 0,5 0,25 0,15 0,1	k. H. k. H. m. H. Sp. 0 0	k. H. k. H. m. H. Sp. 0 0
1.	1,0 0,75 0,5 0,25 0,15 0,1	k. H. k. H. m. H. Sp. 0 0	k. H. k. H. m. H. Sp. 0 0



Tag der Untersuchung post partum	Menge des zugefügten Kolostrums	Grad der Hämolyse bei Verwendung von inaktiviertem Rinderserum	Grad der Hämolyse bei Verwendung von inaktiviertem Ziegenserum
2.	1,0 0,75 0,5 0,25 0,15 0,1	k. H. m. H. Sp. 0 0 0	k. H. m. H. Sp. 0 0 0
3.	1,0 0,75 0,5 0,25 0,15 0,1	k. H. m. H. Sp. 0 0 0	k. H. m. H. Sp. 0 0 0

Endlich untersuchte ich auch das normale Hammelserum auf seine hämolytische Wirkung gegenüber einer 1-proz. Kaninchenblutkörperchen-Aufschwemmung. Der Grad der eingetretenen Hämolyse und die zur Verwendung gelangten Mengen sind aus der folgenden Tabelle ersichtlich.

Röhrchen	Menge des normalen Hammelserums	1-proz. Kaninchenblutaufschwemmung	Grad der Hämolyse
1	1,0	1,0	k. H.
2	0,75	1,0	k. H.
3	0,5	1,0	k. H.
4	0,25	1,0	k. H.
5	0,2	1,0	m. H.
6	0,1	1,0	Sp.
7	0,05	1,0	0
8	0,01	1,0	0
9	0,005	1,0	0
10	0,001	1,0	0

Hiernach hat das normale Hammelserum noch in einer Menge von 0,25 ccm 1 ccm der 1-proz. Kaninchenblutaufschwemmung vollständig aufgelöst; 0,01 ccm löste dasselbe Quantum noch in Spuren auf. Somit ist die hämolytische Wirkung des Hammelserums etwas geringer als diejenige des normalen Rinderserums.

Hieraus ergibt sich, daß das normale Serum von Rind, Ziege und Hammel hämolytische Wirkung auf Kaninchenblut besitzt. Pferdeserum dagegen war selbst in einer Menge von 1 ccm nicht imstande, eine Auflösung der Kaninchenblutkörperchen zu bewirken.

Zum Schlusse machte ich noch einige Untersuchungen, die beweisen sollen, daß die Kolostralmilch, solange sie imstande ist, die roten Blutkörperchen des Kaninchens aufzulösen, einen hämolytischen Ambozeptor enthält. Außerdem prüfte ich die Kolostralmilch daraufhin, ob sie das Komplement eines bekannten Hämolsins ersetzen kann, bzw. ob sie überhaupt Komplement enthält. Diese Versuche sollen zeigen, daß es sich bei der Auflösung der roten Blutkörperchen um einen wirklichen spezifischen Prozeß handelt, der sich durch das Zusammenwirken von hämolytischem Ambozeptor und Komplement erklären läßt.

Zum Nachweise von Komplement in der Kolostralmilch benutzte ich als hämolytischen Ambozeptor ein Serum von Kaninchen, die mit Hammelblutkörperchen vorbehandelt worden waren. Dieses Serum war imstande,

noch bei einer Verdünnung von 1:2000 eine 5-proz. Hammelblutaufschwemmung innerhalb 2 Stunden vollständig aufzulösen. Bei meinen Versuchen gelangte eine 1-proz. Aufschwemmung von Hammelblutkörperchen zur Verwendung. Das hämolytische Kaninchenserum wurde im Wasserbade von 56° C während 1/2 Stunde erwärmt und dadurch inaktiviert. Von diesem wurden 0,2 ccm zu den Versuchen verwendet. Als Komplement diente aktive Kolostralmilch und zwar in verschiedenen Mengen. Der Kontrollversuch bestand darin, daß Meerschweinchenkomplement, hämolytischer Ambozeptor und obige Blutaufschwemmung in ein Röhrchen zusammengebracht wurden. — Außerdem untersuchte ich noch als Kontrolle die Milch einer gesunden, altmilchenden Kuh in derselben Weise wie die Kolostralmilch. Näheres ist aus folgender Tabelle ersichtlich.

Röhrchen	Aktive Kolostralmilch	Hämolytischer Ambozeptor	1-proz. Hammelblutkörperchen-Aufschwemmung
1	1,0	0,2	1,0
2	0,75	0,2	1,0
3	0,5	0,2	1,0
4	0,25	0,2	1,0
5	0,15	0,2	1,0
6	0,1	0,2	1,0
7	Meerschweinchenkomplement 0,1	0,2	1,0
8	dgl.	—	1,0
9	—	0,2	1,0
10	Aktive Kolostralmilch 1,0	—	1,0
11	Physiologische Kochsalzlösung 1,0	—	1,0

Nach diesem Schema untersuchte ich die Kolostralmilch der Kuh III am 4. Tage post partum. In keinem der mit Milch beschickten Röhrchen ist Hämolyse eingetreten. Die Kontrollen waren positiv.

Eine Probe von Kuh No. XII gelangte am 2. Tage nach der Geburt zur Untersuchung. Die Milch dieser Kuh löste in keinem Röhrchen die roten Hammelblutkörperchen auf. Die Kontrollröhrchen stimmten.

Die Kolostralmilch der Kuh No. XIII vom 2. Tage zeigte im Röhrchen 1 eine mäßige Lösung der Blutkörperchen, in Röhrchen 2 war noch Spur von Hämolyse eingetreten. Es enthielt somit die Kolostralmilch dieser Kuh am 2. Tage post partum Komplement.

Die Kolostralmilch der Kuh No. XIV wurde am 1. Tage post partum auf ihren Komplementgehalt untersucht. Während in Röhrchen 1 mäßige Hämolyse eingetreten ist, waren die Blutkörperchen in den übrigen mit Milch beschickten Röhrchen nicht gelöst. Die Kontrollen stimmten.

Die Kolostralmilch dieser Kuh enthielt am 1. Tage post partum Komplement.

Bei Kuh No. XV waren die Untersuchungen vom 2. und 3. Tage post partum negativ. In keinem der Röhrchen, welche aktive Kolostralmilch enthielten, ist Auflösung der Hammelblutkörperchen eingetreten. Die aktive Kolostralmilch der Kuh No. XVI wurde unmittelbar nach dem Kalben untersucht. In jedem mit 1,0, 0,75 und 0,5 ccm Kolostralmilch beschickten Röhrchen ist vollständige Hämolyse eingetreten. Am 1. Tage post partum war jedoch nur noch in dem mit 1 ccm aktiver Kolostralmilch beschickten Röhrchen vollständige Hämolyse vorhanden. In den anderen Röhrchen war keine Hämolyse eingetreten.



Die Kolostralmilch dieser Kuh enthielt sonach bei ihrer Untersuchung direkt im Anschluß an das Kalben reichlich Komplement.  
Zur Uebersicht schließe ich folgende Tabelle an.

No. der Kuh	Tag der Untersuchung post partum	Menge des zugefügten Kolostrums	Grad der Hämolyse	Bemerkungen
Kuh No. III	4.	1,0	0	Kontrollen positiv
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
Kuh No. XII	2.	1,0	0	Kontrollen positiv
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
Kuh No. XIII	2.	1,0	m. H.	Kontrollen positiv
		0,75	Sp.	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
Kuh No. XIV	1.	1,0	m. H.	Kontrollen positiv
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
Kuh No. XV	2.	1,0	0	Kontrollen positiv
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
Dgl.	3.	1,0	0	Kontrollen positiv
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	
Kuh No. XVI	1 Stunde	1,0	k. H.	Kontrollen positiv
		0,75	k. H.	
		0,5	k. H.	
		0,25	m. H.	
		0,15	0	
		0,1	0	
Dgl.	1.	1,0	k. H.	Kontrollen positiv
		0,75	0	
		0,5	0	
		0,25	0	
		0,15	0	
		0,1	0	

Es enthielt somit die Kolostralmilch der Kuh No. XIII, XIV und XVI Komplement. Die Menge desselben ist direkt im Anschluß an die Geburt am größten, nimmt aber rasch ab, so daß am 3. Tage post

partum kein Komplement mehr vorhanden ist. Nur in einem Falle, Kuh No. III, war es bis zum 5. Tage nach dem Kalben nachweisbar.

Zum Nachweis eines hämolytischen Ambozeptors verwendete ich als Komplement Meerschweinchen Serum in einer Verdünnung von 1 ccm in 9 ccm physiologischer Kochsalzlösung und eine 1-proz. Kaninchenblutkörperchen-Aufschwemmung. Die Kolostralmilch wurde durch Erwärmen inaktiviert. Die Art der Untersuchung ist in folgendem tabellarisch angeordnet.

Röhrchen	Hämolytischer Ambozeptor	Meerschweinchenkomplement 1:10	1-proz. Kaninchenblutkörperchen-Aufschwemmung
1	Inaktivierte Kolostralmilch 1,0	0,1	1,0
2	Dgl.	—	1,0
3	—	0,1	1,0
4	Physiologische Kochsalzlösung 1,0	—	1,0
5	Inaktiviertes Rinderserum 0,2	0,1	1,0
6	Dgl.	—	1,0

Die Kühe I—XVI untersuchte ich am 1., 2. und 3. Tage post partum auf das Vorhandensein von hämolytischem Ambozeptor nach dem oben angegebenen Schema. Bei den Kühen III, VII, XI und XVI trat in den mit inaktiverter Kolostralmilch, Meerschweinchenkomplement und Kaninchenblutaufschwemmung beschickten Röhrchen am 1. Tage post partum komplette Hämolyse ein. Am 2. Tage post partum war in den auf dieselbe Weise beschickten Röhrchen der Kühe VII, XI und XVI nur noch eine Spur von Hämolyse vorhanden.

Am 3. Tage post partum war in der Kolostralmilch dieser Kühe ein hämolytischer Ambozeptor nicht mehr festzustellen. In der Milch von Kuh III war am 2. Tage post partum mäßige Hämolyse eingetreten. Eine Probe der Kuh III und XVI wurde direkt im Anschluß an das Kalben untersucht. Die Kolostralmilch dieser Kühe enthielt reichlich hämolytischen Ambozeptor. Bei den Kühen V und VI konnte ich in der Kolostralmilch nur am 1. Tage post partum hämolytischen Ambozeptor nachweisen, insofern als in den Röhren, welche inaktivierte Kolostralmilch,

Kuh No.	Grad der eingetretenen Hämolyse in den einzelnen mit inaktiverter Kolostralmilch, Meerschweinchenkomplement und Kaninchenblutkörperchen-Aufschwemmung beschickten Röhrchen zum Nachweise eines hämolytischen Ambozeptors am		
	1. Tage post partum	2. Tage post partum	3. Tage post partum
I	0	0	0
II	0	0	0
III	k. H.	m. H.	0
IV	0	0	0
V	m. H.	0	0
VI	m. H.	0	0
VII	k. H.	Sp.	0
VIII	0	0	0
IX	0	0	0
X	0	0	0
XI	k. H.	Sp.	0
XII	0	0	0
XIII	0	0	0
XIV	0	0	0
XV	0	0	0
XVI	k. H.	Sp.	0

Meerschweinchenkomplement und Kaninchenblutaufschwemmung enthielten, eine mäßige Hämolyse eintrat. Die Kolostralmilch der Kühe I, II, IV, VIII, IX, X, XII, XIII, XIV und XV enthielt selbst am 1. Tage post partum keinen hämolytischen Ambozeptor. Eine Uebersicht gibt vorstehende Tabelle.

Der Nachweis eines hämolytischen Ambozeptors gelang demnach nur in der Minderzahl der von mir untersuchten Kolostralmilchen; Komplement war fast in allen Fällen festzustellen. Hämolytischer Ambozeptor ist also in geringerer Menge in der Kolostralmilch vorhanden als Komplement; in denjenigen Milchproben, in denen mir der Nachweis des hämolytischen Ambozeptors nicht gelang, dürfte er doch vorhanden gewesen sein, jedoch nur in so geringer Menge, daß er mit meiner Untersuchungstechnik nicht nachweisbar war.

### V. Zusammenfassung und Schlußsätze.

Aus meinen Untersuchungen ergibt sich, daß die Kolostralmilch Komplement und hämolytischen Ambozeptor enthalten kann. Komplement konnte ich in 14, Ambozeptor in 6 Kolostralmilchen nachweisen, das ist in 87,5 und in 37,5 Proz. der untersuchten Fälle. Der Grad der eingetretenen hämolytischen Wirkung war bei den verschiedenen Kolostralmilchproben verschieden stark ausgeprägt.

Weder Komplement noch hämolytischen Ambozeptor konnte ich feststellen in den Kolostralmilchen der Kühe I und II. Sie gelangten allerdings erst am 3. bzw. 2. Tage post partum zur Untersuchung.

In der Kolostralmilch der Kuh No. III war während 5 Tagen Komplement und in den beiden ersten Tagen post partum auch hämolytischer Ambozeptor vorhanden. Nur eine geringe Menge Komplement wies die Kolostralmilch der Kuh No. IV bei ihrer Untersuchung am 2. Tage post partum auf. Es war nur in Spur vorhanden.

Das Kolostrum der Kuh No. V besaß 2 Tage Komplement, am 1. Tage post partum auch hämolytischen Ambozeptor.

Ebenso konnte ich in der Kolostralmilch der Kuh No. VI 3 Tage post partum Komplement und am 1. Tage hämolytischen Ambozeptor feststellen.

In der Kolostralmilch der Kuh No. VII war in den beiden ersten Tagen post partum Komplement und ebensolange hämolytischer Ambozeptor vorhanden.

Ein Gehalt an Komplement in der Kolostralmilch war bei Kuh No. VIII 3 Tage, bei Kuh No. IX 2 Tage und bei Kuh No. X 3 Tage post partum festzustellen. Hämolytischen Ambozeptor konnte ich in diesen Milchen nicht nachweisen.

Die Kolostralmilch der Kuh No. XI enthielt 3 Tage post partum Komplement und 2 Tage hämolytischen Ambozeptor.

Bei Kuh XII und XIII stimmen die Resultate überein, insofern als in beiden Kolostren bis zum 2. Tage post partum Komplement und an keinem Tage hämolytischer Ambozeptor festzustellen war; ebenso war in der Kolostralmilch der Kühe XIV und XV 3 Tage post partum nur Komplement enthalten.

Der Komplementgehalt in der Kolostralmilch der Kuh No. XVI war bei der Untersuchung 1 Stunde nach dem Kalben sehr groß. Am 3. Tage post partum war jedoch die Menge so klein, daß das Komplement nur noch in Spur nachzuweisen war. Hämolytischen Ambozeptor besaß diese Milch bis zum 2. Tage post partum.

Eine tabellarische Zusammenstellung über die Dauer des Gehaltes an Komplement und hämolytischem Ambozeptor gebe ich im folgenden:

Kuh No.	Komplement war vorhanden bis zum Tage post partum	Hämolytischer Ambozeptor war vorhanden bis zum Tage post partum
I	0	0
II	0	0
III	5	2
IV	2	0
V	2	1
VI	3	1
VII	2	2
VIII	3	0
IX	2	0
X	3	0
XI	3	2
XII	2	0
XIII	2	0
XIV	3	0
XV	3	0
XVI	3	2

Es war demnach in den 16 untersuchten Kolostralmilchen in einer größeren Zahl von Fällen Komplement vorhanden, und zwar in 6 Kolostralmilchproben nur die beiden ersten Tage, in 7 Kolostralmilchproben bis zum 3. Tage nach dem Kalben. Nur in einer Milch konnte über diese Zeit ein Komplementgehalt bis zum 5. Tage post partum nachgewiesen werden. Demnach dürfte als Regel gelten, daß Komplement in der Kolostralmilch bis zum 2. bzw. 3. Tage post partum vorhanden ist. In einzelnen Fällen kann es auch längere Zeit, bis zum 5. Tage post partum, vorkommen. Die Menge dieses Komplements ist in den ersten Stunden nach dem Kalben am größten. Sie nimmt stetig ab und ist an den oben bezeichneten Tagen gerade noch in nachweisbarer Menge festzustellen.

Was den Gehalt an hämolytischem Ambozeptor in der Kolostralmilch betrifft, so läßt sich dafür keine bestimmte Regel aufstellen, da die Menge desselben sehr großen individuellen Schwankungen unterworfen und in der Mehrzahl von Kolostralmilchen überhaupt nicht festzustellen ist.

Mit diesem Befunde stehe ich mit Kopf und Sassenhagen insofern in Widerspruch, als diese in der Kolostralmilch viel länger, bis zum 17. und 19. Tage post partum Komplement nachgewiesen haben wollen. In bezug auf den Gehalt an hämolytischem Ambozeptor stimme ich mit Kopf überein. Er konnte einen hämolytischen Ambozeptor auch in den allerersten Tagen nach der Geburt in allen von ihm untersuchten Kolostralmilchen feststellen.

Wie läßt sich nun die Herkunft des hämolytischen Ambozeptors und des Komplements in der Kolostralmilch erklären?

Wie aus meinen Untersuchungen hervorgeht, enthält das Rinderserum Hämolsine auf Kaninchenblut. Es ist eine bekannte Tatsache, daß die Kolostralmilch im Anschluß an die Geburt Bestandteile des Blutes, speziell Serum, enthält. Durch die sehr starke und längere Zeit anhaltende Hyperämie des Euters werden die Gefäßwände für diese Blutbestandteile durchlässig. Demnach sind das Komplement und der hämolytische Ambozeptor in die Kolostralmilch nur übergegangen. Das

Hämolysin der Kolostralmilch ist somit nur ein Bestandteil des normalen Rinderserums, welches auf die geschilderte Art und Weise in die Kolostralmilch gelangt. Je mehr Serum durch die Gefäßwände durchtritt, desto reichlicher werden der hämolytische Ambozeptor und das Komplement in der Kolostralmilch vorhanden sein. Weiterhin werden der hämolytische Ambozeptor und das Komplement um so länger in der Kolostralmilch nachzuweisen sein, je länger die Hyperämie des Euters besteht, und die Blutbestandteile sich der Kolostralmilch in mehr oder weniger großer Menge beimischen. Bei der physiologischen Euterhyperämie, die in der Regel nach einigen Tagen post partum verschwunden ist, werden der hämolytische Ambozeptor und das Komplement nur so lange nachzuweisen sein, als diese Hyperämie besteht. Aus meinen Versuchen geht dies auch insofern hervor, als sich der hämolytische Ambozeptor und das Komplement am 3. bzw. 4. Tage nicht mehr nachweisen ließen. Nur in einem Falle, wo während 4 Tagen ein Euterödem bestand, gelang der Nachweis des Komplements bis zum 5. Tage post partum.

Damit ließen sich vielleicht auch die Unterschiede in den Resultaten der Untersuchungen von Kopf, Sassenhagen und mir erklären. Es ist vielleicht anzunehmen, daß bei den von ihnen untersuchten Tieren eine sehr starke Euterhyperämie längere Zeit bestanden hat. Dadurch wären der Kolostralmilch längere Zeit und in größerer Menge eben diese Blutbestandteile beigemischt worden, die ihnen den Nachweis des Komplements so lange ermöglichten.

Auf Grund meiner Untersuchungen halte ich mich zu der Annahme berechtigt, daß es sich bei der hämolytischen Wirkung der Kolostralmilch um einen wirklich spezifischen Prozeß handelt, der sich nur durch das Zusammenwirken eines hämolytischen Ambozeptors und eines Komplements erklären läßt. Von einem hämolytischen Komplement zu reden, ist nicht angängig, da der wirklich lösende Bestandteil nicht das Komplement darstellt, sondern dieser in dem beigefügten Rinderserum enthalten ist. Der spezifische Körper ist der Ambozeptor. Es handelt sich also um ein gewöhnliches, nicht spezifisches Komplement, wie solches im Serum einer jeden Tierart vorhanden ist.

Ferner habe ich festgestellt, daß die Entnahme der Kolostralmilch als Anfangs- oder Restmilch, sowie das Melken bzw. Saugen des Kalbes keinen Einfluß auf das Vorkommen der Hämolysine in der Kolostralmilch bzw. deren Menge besitzt. In der Anfangs- und Endmilch war der hämolytische Ambozeptor und das Komplement in gleicher Menge vorhanden.

Für die Diagnose des Frischmilchendseins ist der Nachweis der hämolytischen Wirkung der Kolostralmilch von sehr untergeordneter Bedeutung. Die Kolostralmilch besitzt ungefähr nur so lange hämolytischen Ambozeptor und Komplement, als sie physikalisch schon als Kolostralmilch zu erkennen ist bzw. eine vorausgegangene Geburt durch eine klinische Untersuchung ohne weiteres festgestellt werden kann.

Meine Untersuchungen lassen sich in folgenden Sätzen zusammenfassen:

- 1) Die Kolostralmilch einzelner Kühe enthält hämolytischen Ambozeptor und Komplement.
- 2) Der hämolytische Ambozeptor ist in der Regel nur bis zum 2. Tage post partum in der Kolostralmilch nachzuweisen.

3) Komplement ist in der Kolostralmilch länger vorhanden als der hämolytische Ambozeptor. Es kann in der Regel bis zum 3. Tage post partum nachgewiesen werden, ausnahmsweise bis zum 5. Tage.

4) Der hämolytische Ambozeptor und das Komplement sind in der Anfangs- und Endmilch in gleicher Menge vorhanden.

5) Der hämolytische Ambozeptor und das Komplement in der Kolostralmilch der Kuh sind nichts anderes, als Bestandteile des normalen Rinderserums, die sich durch Filtration durch die Gefäßwände der Kolostralmilch beigemischt haben.

6) Für den Nachweis des Frischmilchendseins der Kühe ist die hämolytische Wirkung der Kolostralmilch ohne praktische Bedeutung.

Am Schlusse meiner Arbeit gestatte ich mir, dem Vorstand des Instituts für Seuchenlehre der Kgl. Tierärztl. Hochschule, Herrn Prof. Dr. Reinhardt, für die Ueberweisung des Themas sowie für das stets entgegengebrachte Interesse meinen wärmsten Dank auszusprechen.

#### Literatur.

- 1) Bauer, Zur Biologie des Kuhkolostrums. (Dtsche med. Wochenschr. 1909.)
- 2) Bauer u. Sassenhagen, Der forensische Nachweis des Frischmilchendseins der Kühe. (Berlin. tierärztl. Wochenschr. 1911.)
- 3) Bordet, Sur l'agglutination et la dissolution des globules rouges par le sérum d'animaux. (Ann. de l'Inst. Pasteur. 1898/1899; zit. nach 18.)
- 4) Buchner, Zur Kenntnis der Alexine, sowie der spezifisch bakteriziden und spezifisch hämolytischen Wirkungen. (München. med. Wochenschr. 1900.)
- 5) Creite, Versuche über die Wirkung des Serumeiweißes nach Injektionen in das Blut. (Zeitschr. f. ration. Med. 1869; zit. nach 18.)
- 6) Ehrlich u. Morgenroth, Ueber Hämolsine. (S. Ehrlich, Gesamm. Arbeit. über Immunitätsforsch. Berlin 1904.)
- 7) Ehrlich u. Sachs, Ueber den Mechanismus der Ambozeptorenwirkung. (Siehe Ehrlich, Gesamm. Arbeit. über Immunitätsforsch. Berlin 1904.)
- 8) Gürber, Zur Kenntnis der Chemie und Physiologie des Blutserums. Beiträge zur Physiologie. (Festschr. f. A. Frick. Braunschweig 1899; zit. nach 18.)
- 9) Kopf, Haptine in Rinderserum und Milch. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 63. 1909) [Auch als Inaug.-Dissert. erschienen.]
- 10) Landois, Die Transfusion des Blutes. Leipzig 1875.
- 11) Lane-Clayton, On the presence of haemolytic factor in milk. (Journ. of Pathol. and Bacteriol. Vol. 13. 1908; zit. nach 9.)
- 12) Lenzen, Ueber die Bedeutung und den praktischen Wert der gebräuchlichsten Untersuchungsmethoden der Milch. Leipzig 1911.
- 13) Lüdke, Beiträge zur Hämolyse. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. 37. 1904.)
- 14) Morgenroth u. Sachs, Ueber die Komplementierbarkeit der Ambozeptoren. (S. Ehrlich, Gesamm. Arbeit. über Immunitätsforsch. Berlin 1904.)
- 15) Noeggerath u. Kolff, Serologische Untersuchungen zur Theorie der Säuglingsernährung. (Dtsche med. Wochenschr. 1909.)
- 16) Panum, Experimentelle Untersuchung über die Transfusion. (Virchows Arch. Bd. 28; zit. nach 18.)
- 17) Pfaundler u. Moro, Ueber hämolytische Substanzen der Milch. (Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Ther. Berlin 1907.)
- 18) Rissling, Beiträge zur Biologie normaler Tiersera. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. 44. 1907.)
- 19) Sachs, Gibt es eine einheitliche Alexinwirkung? (S. Ehrlich, Gesamm. Arbeit. über Immunitätsforsch. Berlin 1904.)
- 20) Sachs u. Bauer, Das Zusammenwirken mehrerer Ambozeptoren bei der Hämolyse. (Arbeit. a. d. Instit. f. experim. Ther. Frankfurt a./M. 1907.)
- 21) Sassenhagen, Ueber die biologischen Eigenschaften der Kolostral- und Mastitis-milch. [Inaug.-Dissert.] Stuttgart 1910.
- 22) Stern, Pouvoir hémolytique du sérum sanguin normal chez différentes espèces d'animaux. (Compt. rend. de la Soc. de Biol. T. 56. 1904; zit. nach 18.)



*Nachdruck verboten.*

## Experimentelle Tropicdysenterie. Die *Entamoeba* beim Affen<sup>1)</sup>.

[Aus der medizinischen Klinik der Universität Rom  
(Vorsteher: Prof. G. Baccelli)

Abteilung für Tropenkrankheiten (Leit. Arzt: Prof. U. Gabbi).]

Von Dr. G. Franchini, Dozenten und Assistenten.

Mit 1 Tafel und 1 Figur.

Die Faeces eines Tropicdysenteriekranken (dieser Fall wurde von Gabbi beschrieben) wurden einem gesunden und kräftigen Affen, der sich seit mehr als einem Jahr in unserem Laboratorium befand, auf rectalem Wege eingepft. Unter den Faeces, welche mir von dem Kranken während einer Periode der Verschlimmerung der Krankheit geliefert wurden, wählte ich diejenigen aus, die makroskopisch den größten Gehalt an Blut und Schleim zeigten, ließ sie in einer physiologischen Kochsalzlösung zergehen und spritzte sie vermittelst einer mit einem Gummischlauch versehenen, ziemlich langen Glaskanüle, mit welcher ich hoch in den Mastdarm eindringen konnte, in diesen ein. Die erste Einspritzung wurde am 10., die zweite am 18. und die dritte am 20. Febr. gemacht. Die eingespritzte Menge betrug jedesmal 5—10 ccm. Bei der letzten Einspritzung konnte ich, da Pat. nach Rom gekommen, ziemlich frische, stark schleim- und bluthaltige Faeces einführen. Bei der mikroskopischen Untersuchung waren in den Faeces stets, jedoch nicht sehr zahlreiche Amöben, und zwar vorwiegend der Art *tetragena*, nachweisbar.

Der Kranke war in Mittelamerika infiziert worden, wo die Dysenterie endemisch ist und wo zu der betreffenden Zeit eine schwere Epidemie geherrscht hatte.

Der inokulierte Affe zeigte während und nach der Einspritzung keine besonderen Störungen. Die Klystiere wurden wenigstens einige Stunden retiniert, während welcher er unter Beobachtung gehalten wurde.

Während der Monate Februar und März zeigte das Tier keinerlei Erscheinungen; es fraß mit großem Appetit, hatte keine Fieber und entleerte feste Stühle. Anfang April fing es, obwohl es seinen guten Appetit und seine normale Munterheit beibehielt, an, etwas abzumagern. Ich konnte, infolge der Ungezähmtheit des Tieres, nicht den Verlauf des Körpergewichtes verfolgen. Der Affe zeigte weder Fieber noch Durchfall.

Anfang Mai war er schon stark abgemagert; gegen den 10. dieses Monats wurde er plötzlich vom Durchfall heimgesucht, dessen Intensität sich während der folgenden Tage bedeutend steigerte. Die Abmagerung wurde eine ganz auffallende; die Stuhlentleerungen erfolgten häufig; es wurde aber jedesmal nur eine geringe Menge entleert. Die Stühle enthielten fast stets kleine Schleimmassen mit Beimengung von Blutflecken oder -streifen, ganz ähnlich dem, was die Franzosen „crachat rectal“ nennen; zuweilen war der Schleim dünnflüssiger, grün oder schwärzlich gefärbt. Der Durchfall war an gewissen Tagen ein so starker, daß während einer Beobachtungsstunde 7—8 Stuhlentleerungen erfolgten, welche, soweit aus den Aeüßerungen des Tieres zu schließen war, von

1) Ins Deutsche übertragen von Dr. med. K. Rühl (Turin).

starken Tenesmus begleitet waren. Das Tier hatte fortwährend einen starken Durst und fraß fast nichts mehr. Der Harn enthielt Eiweiß, jedoch nicht in großer Menge; im Sediment waren keine Zylinder nachweisbar. Die mehrmals ausgeführte Blutuntersuchung ergab keine Eosinophilie, sondern ein starkes Vorwiegen der Uninukleierten im Vergleich zu den Multinukleierten<sup>1)</sup>. Bei der letzten Untersuchung fand ich beispielsweise bei 100 Leukocyten:

Neutrophile Multinukleierte 11,5,  
eosinophile Zellen 1,  
große Uninukleierte 5,  
mittlere Uninukleierte 15,5,  
Lymphocyten 65,5,  
Uebergangsformen 1,5.

Bei normalen Affen ergab die Blutuntersuchung stets ein Vorwiegen der Multinukleierten gegenüber den Uninukleierten.

Die Faeces wurden zum Teil in frischem Zustande untersucht, und zwar in der Weise, daß sie mit Methylenblau gefärbt wurden und ein mit Wasser verdünnter Tropfen zwischen den Objekträger und das Deckgläschen gebracht wurde. Dabei fand ich zahlreiche Amöben, welche jedoch infolge ihrer schwachen Färbung nicht sofort klassifiziert werden konnten. Mit einem weiteren Teil der Faeces wurden Ausstrichpräparate hergestellt, in absolutem Methylalkohol fixiert und zum Teil nach Giemsa, zum Teil nach Romanowsky gefärbt. Ein Teil der Ausstrichpräparate wurde in Osmiumsäure fixiert und wie die anderen gefärbt. Die Resultate dieser Untersuchungen werde ich weiter unten beschreiben.

Da das Tier sich dem Tode zu nähern schien, tötete ich es. Auch während der letzten Lebenstage war die Temperatur fast stets normal, und zuweilen, wie z. B. unmittelbar vor dem Tode, unternormal.

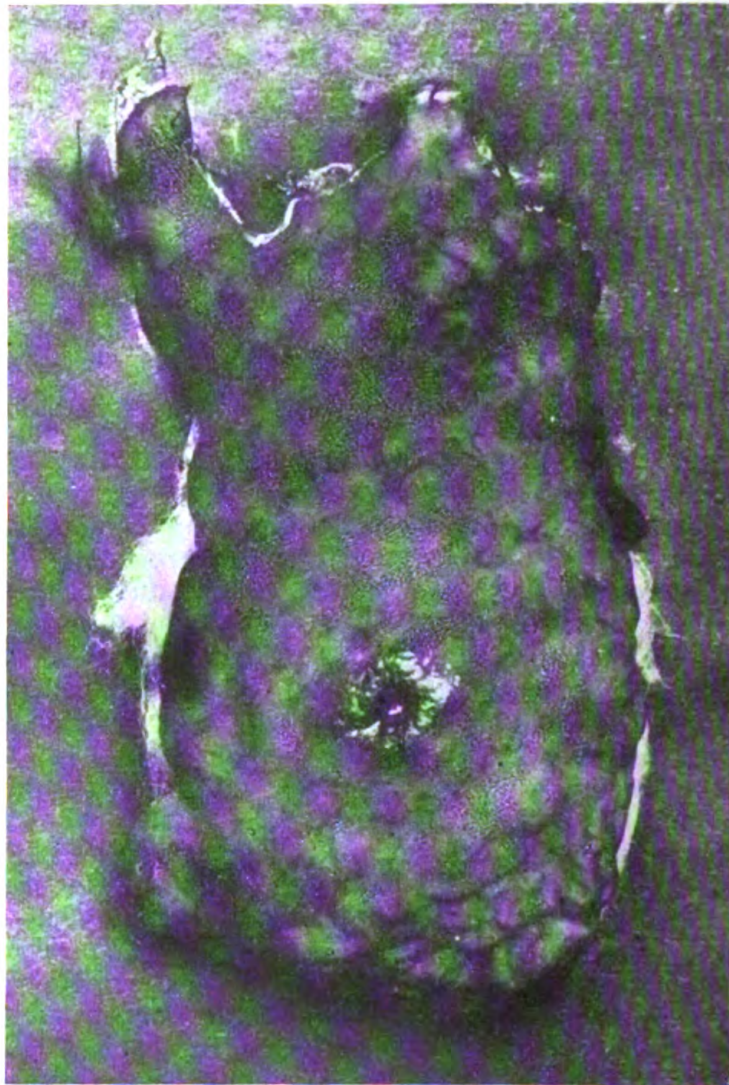
Nekroskopischer Befund. Nach Lostrennung der Haut trat sofort die enorme Magerkeit des Tieres ans Licht; es war fast kein Fettgewebe vorhanden und das Muskelgewebe sehr spärlich. Die Eröffnung der Brust- und Bauchhöhle fördert, wenigstens auf den ersten Blick, nichts Bemerkenswerthes zutage. In der Pleura- und in der Peritonealhöhle ist keine Flüssigkeit vorhanden. Nach Entfernung der Darmschlingen sieht man, daß die retroperitonealen Drüsen angeschwollen sind; hier und da findet man am Mesenterium harte Ganglien, von der Form einer kleinen Bohne. Die thorakalen Organe zeigen nichts Bemerkenswerthes; das Herz ist normal, die Lungen völlig gesund, die Bronchien frei von Alterationen. Ich legte besonderes Gewicht auf eine sorgfältige Untersuchung des Atmungsapparates, da es mir bekannt ist, daß die Affen, besonders wenn sie in Gefangenschaft, d. h. in Laboratorien, leben, leicht der Tuberkulose anheimfallen, obwohl in meinem Fall weder der klinische Symptomenkomplex, noch die Ergebnisse der mikroskopischen Faecesuntersuchung (positiver Amöben-, negativer Tuberkelbacillenbefund) die Annahme einer solchen Infektion nahe legten.

Die Leber war etwas vergrößert und hart. Ich führte zahlreiche Schnitte durch dieselbe, fand aber weder Abszesse, noch Narben, noch besondere Härtungen, welche auf das frühere Bestehen von Abszessen hätten hinweisen können.

Die Milz war sehr klein mit spärlicher Pulpa, Nieren normal. Keine Zeichen von Peritonitis; keine Verwachsungen zwischen den Darmschlingen.

1) Verf. schreibt: „grande prevalenza dei mono sui polinucleati“.

**Darm.** Die Darmschlingen erscheinen infolge reichlicher Gasansammlung ziemlich stark aufgetrieben. Der Dünndarm wurde unmittelbar unterhalb des Pylorus an zwei Stellen unterbunden und in dem zwischen den beiden Schlingen begriffenen Teil durchgeschnitten; dasselbe geschah am untersten Teil des Dickdarmes, nahe dem Rectum. Bei einer sorgfältigen Untersuchung des Dün- und Dickdarmes fand ich nichts Bemerkenswertes. Im Blinddarm fand ich einige schwärz-



liche Flecken, welche offenbar die inneren Schichten der Darmwand interessierten. Ähnliche aber kleinere Flecken mit gleicher Farbe fand ich im Dickdarm, besonders in seinem letzten Teil. Bei Eröffnung des Darmlumens fand man im ganzen Dünndarm flüssige grünlich-gelbe Faeces.

Der Blinddarm zeigte bemerkenswerte Erscheinungen. Die ganze Schleimhaut war durchsetzt mit kleinen, nicht sehr tiefen, mit einer weißlichen Substanz belegten Ulzerationen. Zwischen diesen kleineren fällt ein großes tiefes Geschwür (s. Fig.) auf, welches die ganze Schleimhaut, die Submucosa und einen Teil der Muskelhaut interessiert; die

Ränder dieses kraterförmigen Geschwürs sind mit geronnenem Blut und einer schleimig-eitrigen Masse belegt.

Der Dickdarm, besonders in seinem letzten Teil, dem Rectum, zeigt ebenfalls ziemlich deutliche Veränderungen. Die Schleimhaut des Mastdarmes zeigt eine starke Anschwellung, besonders der Querfalten, welche an gewissen Stellen eine weiß-rötlich-braune, an anderen eine schmutzig-graue Farbe aufweisen. Auf ihrer Oberfläche beobachtet man äußerst zahlreiche kleine, mit Blut und mit einem schleimig-eitrigen Gemisch bedeckte Geschwüre. Der Inhalt des Dickdarmes ist an den verschiedenen Stellen verschieden. Im Blinddarm findet man flüssige blut- und schleimhaltige Faeces; im Colon ist weniger Blut und Schleim vorhanden; im letzten Darmabschnitt beobachtet man hingegen reichlichen Katarrh, durchstreift mit lebhaft rotem Blut. In zahlreichen, mit den Faeces des Coecums und des Rectums hergestellten, und nach Giemsa und nach Romanowsky gefärbten Ausstrichpräparaten konnte ich zahlreiche Amöben nachweisen. Dieselben waren im Coloinhalte spärlicher vorhanden; in den Präparaten aus dem Material, welches durch Abschabung der Ränder und der Umgebung des großen Geschwürs im Blinddarm und der kleinen Geschwüre des Mastdarmes gewonnen wurde, waren sie hingegen reichlich vorhanden. In den mit fäkalem Material hergestellten Präparaten waren die Amöben am zahlreichsten in den rundlichen blutgestreiften Schleimklümpchen vertreten. Auf der Schleimhaut und im Inhalte des Dünndarmes konnte ich keine Amöben nachweisen.

Ich führte auch histologische Untersuchungen aus, zu welchem Zweck ich Stücke der Leber, der Milz, der Niere, der Lymphdrüsen, der verschiedenen Darmabschnitte teils in Formalin, teils in Alkohol, teils in Sublimat + Essigsäure fixierte und mit Hämatoxylin, Hämatoxylin und Eosin, Eosin und Methylenblau färbte.

Aus diesen Untersuchungen ergab sich folgendes: Die Nieren, die Milz und die Leber zeigen nichts Bemerkenswerthes. Die Lymphdrüsen weisen eine bedeutende Hyperplasie besonders der Follikel auf, welche wie vergrößert und miteinander zusammengeschmolzen erscheinen.

Die mikroskopische Untersuchung des Dünndarmes ergab nichts Bemerkenswerthes, obwohl verschiedene Partien desselben untersucht wurden.

**Dickdarm, Blinddarm.** Ein Schnitt durch den ulzerierten Teil ergab eine fast vollständige Zerstörung der Schleimhaut, der Submucosa und eines Teiles der Muscularis. In der Umgebung beobachtet man zahlreiche nekrotische Herde in der Mucosa und Submucosa mit zahlreichen Blutergüssen.

**Mastdarm.** Auch hier beobachtet man nekrotische Herde in der Schleimhaut mit einer ausgebreiteten Kleinzelleninfiltration. Man beobachtet ferner eine hämorrhagische Infiltrierung des Bindegewebes der Mucosa und Submucosa. In diesen beiden Schichten beobachtet man sowohl im ulzerierten Abschnitt wie im Mastdarm rundliche oder eiförmige, schwach blau gefärbte Körperchen, deren Gestalt an die Amöben erinnert.

Obwohl in diesem Fall die Vorgeschichte (Einspritzung von Faeces eines Amöbendysenteriekranken in den Mastdarm) das klinische Bild und der nekroskopische Befund (besondere Läsionen mit besonderen Lokalisierungen) keinen Zweifel über die Aetiologie der Krankheit ge-



statteten, fahndete ich im Blutserum des Tieres auf Agglutinine für verschiedene Dysenteriebacillenarten, die ich im Laboratorium besaß, nämlich für den Typus Shigas, Flexners und Cellis. Ich stellte verschiedene Verdünnungen her, von der minimalen (1:10) beginnend und untersuchte im hängenden Tropfen; die Bacillen behielten aber, selbst nach längerer Zeit, eine lebhaftige Beweglichkeit bei. Es war somit die Möglichkeit ausgeschlossen, daß neben der Amöben- auch eine bacilläre Dysenterie bestehe. Denselben Befund lieferte auch der Kranke, mit dessen Faeces der Affe infiziert worden war.

Die Versuche, die Amöben zu kultivieren, ergaben eigentlich keine befriedigenden Resultate, obwohl diejenigen Nährsubstrate benutzt wurden, welche frühere Untersuchungen als sehr geeignet für die Entwicklung einiger Amöbenarten erwiesen hatten, nämlich das Nicollesche Blutagar, das „Heuagar“<sup>1)</sup>, das Agar mit Zusatz von Leber- oder Milzextrakten. Wenn man aber bedenkt, wie leicht solche Amöbenarten sich abschwächen und sterben, wenn sie sich außerhalb ihres normalen Milieus — Darm und Leber — befinden, so begreift man, daß ihre Kultivierung auf künstlichen Nährsubstraten sehr schwer gelingen muß.

Was nun die Klassifizierung dieser Amöben anbelangt, so glaube ich, daß sie ihrer Größe und besonders der Beschaffenheit ihrer Kerne nach wenigstens größtenteils mit der *Amoeba tetragena* zu identifizieren sind, welche Viereck 1907 beschrieben hat.

In den Taf. I und II sind zahlreiche Amöben abgebildet, welche zum Teil in Faecesausstrichpräparaten zum Teil in Präparaten aus der Wand des Dickdarms sichtbar waren. In der ersten Tafel zeigen die Amöben verschiedene Form und Größe und eine verschiedene Zahl von Kernen und Vakuolen. Ein Teil von ihnen ist nach Giemsa, ein Teil mit Eosin und Methylenblau gefärbt. In einigen beobachtet man zahlreiche Bakterien, welche durch ihre randständige Lage Geißeln vortäuschen. In der Taf. II sind die Amöben im allgemeinen gut gefärbt und haben eine ziemlich gleichmäßige Größe. Man beobachtet in derselben eine Gruppe von 6, welche eine ovale Form, ein zum Teil rosig, zum Teil blau gefärbtes Protoplasma, zahlreiche, intensiver rötlich gefärbte Kerne und zahlreiche Bacillen im Endoplasma zeigen.

Die Versuche, Tiere zu infizieren, fielen besonders bei jungen Katzen und Hunden positiv aus. Bei Affen wurde die Krankheit selten und nur auf dem Wege des Magens erzeugt.

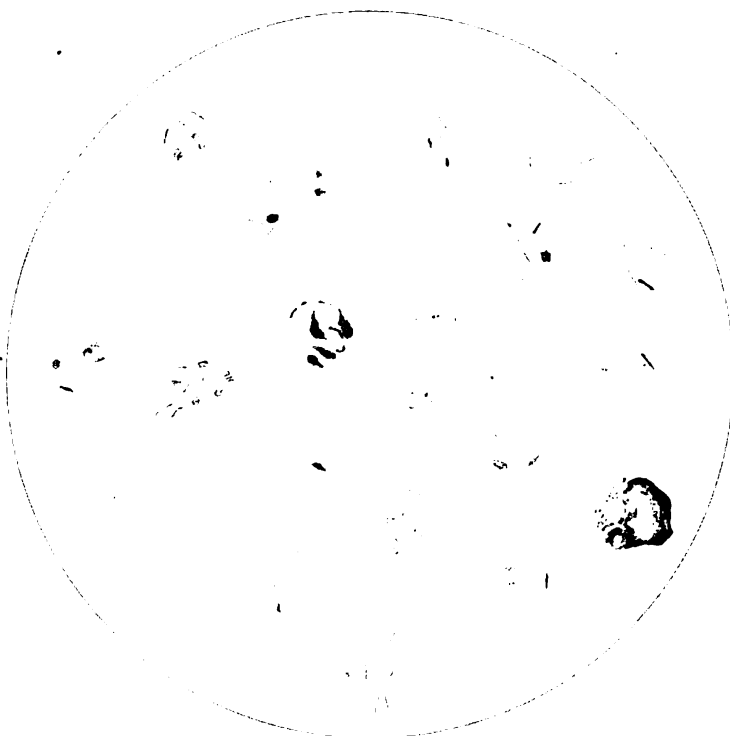
Nach der Meinung Schaudinns sollen die frischen Faeces der Dysenteriekranken bei der Katze keine Krankheitsform herbeiführen, während zum Teil ausgetrocknete und Cysten enthaltende Faeces letale Wirkungen haben sollen. Bei der Katze entwickelt sich die Krankheit nach 2—3 Tagen mit denselben Charakteren wie die menschliche Dysenterie; die Tiere gehen nach 10—15 Tagen zugrunde.

Die inokulierte Krankheit ist kontagiös, wie aus den Versuchen Jürgens' hervorgeht; dieser Autor beobachtete, daß 2 gesunde Katzen, welche zusammen mit infizierten Katzen in einen und denselben Käfig getan wurden, nach 12—15 Tagen von der Krankheit befallen wurden.

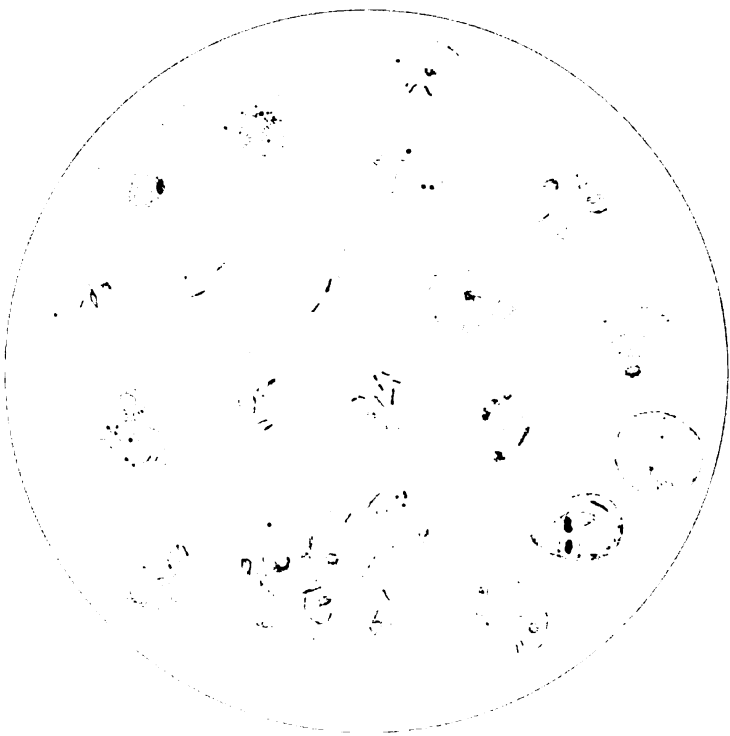
Bemerkenswert sind auch die neueren Untersuchungen von Lesage, welcher nachgewiesen hat, daß die Amöbendysenterie auch auf hypodermatischem, nasalem und intravenösem Wege übertragbar ist, und daß ferner eine echte Amöbenseptikämie mit positivem Amöbenbefunde im Blute und in anderen Organen außer dem Darm entstehen kann.

1) Verf. schreibt „agar fieno“.

1.



2.







Ich konnte leider, obwohl ich noch über weitere Affen im Laboratorium verfügte, keine weiteren Versuche von Verimpfung der Amöben ausführen, weil diese zum Teil für andere Zwecke bestimmt waren, und zum Teil schon mit anderen Keimen verimpft waren. Bei einer Katze, die zu gleicher Zeit mit dem Affen auf intrarectalem Wege inokuliert wurde, trat die Krankheit nicht auf; diesbezüglich ist jedoch zu bemerken, daß diese nur auf junge Tiere übertragbar ist. Bei Kaninchen fielen die Infektionsversuche stets negativ aus.

Bei dem mit positivem Resultat inokulierten Affen fand ich, obwohl das Tier lange Zeit nach der Infektion getötet wurde, sowohl makro- wie mikroskopisch keine Leberabszesse.

\* \* \*

Nach all dem Gesagten glaube ich, einen jeden Zweifel über die amöbische Natur der erzeugten Dysenterie ausschließen zu können. Es würde allein der positive Amöbenbefund in den Faeces schon genügen; die Diagnose wird aber außerdem durch den pathologisch-anatomischen Befund (besonderer Läsionen mit besonderer Lokalisierung) und den histologischen Befund bestätigt. Die bacilläre Dysenterie ruft bekanntlich nie so schwere ulceröse Läsionen hervor, wie ich sie bei meinem Affen beobachtete; ferner haben die Untersuchungen von Strong und Jürgens nachgewiesen, daß die Faeces der Bacillendysenteriekranken, wenn sie intrarectal eingeimpft werden, nicht pathogen wirken; schließlich spricht gegen die Annahme einer Bacillendysenterie der Umstand, daß das Blutserum des Affens auf verschiedene Varietäten von Dysenteriebacillen keine agglutinierende Wirkung ausübte.

Der von mir beschriebene Fall ist in doppelter Beziehung interessant, und zwar:

- 1) Weil er den ersten Fall von experimenteller Infektion des Affens auf intrarectalen Wege mit der *Amoeba tetragena* (der Dysenterie) darstellt;
- 2) wegen des klinischen Verlaufs der Krankheit.

In der Tat, die Krankheit entwickelt sich z. B. bei jungen Katzen nach 2—3 Tagen, und endet meistens gegen den 15. Tage mit dem Tode. In unserem Fall brach hingegen die Krankheit nach ungefähr 3 Monaten aus, und zwar so rasch und intensiv, daß sie in wenigen Tagen das Tier zum Tode führte<sup>1)</sup>.

Wie erklärt sich dieser vom gewöhnlichen so stark abweichende Verlauf? Man könnte vielleicht an einen großen Widerstand denken, den der Organismus gegen die Wirkung der Amöben geleistet hat und welche lange Zeit das pathogene Vermögen der Parasiten neutralisieren konnte, oder man könnte annehmen, daß die in den Darm eingeführten Amöben abgeschwächt und wenig virulent waren, so daß sie so lange als harmlose Parasiten im Darmlumen oder in der Dicke seiner Wände gelebt haben, bis entweder sie selbst infolge der günstigen Lebensverhältnisse eine größere Virulenz angenommen haben, oder der Organismus infolge irgendeiner einer lokalen oder allgemeinen Ursache abgeschwächt wurde und infolgedessen nicht mehr imstande war, die Wirkung der Amöben zu neutralisieren. Ich neige zu dieser zweiten Hypothese, welche durch das lange Fehlen eines jeden klinischen Symptomes nahe gelegt wird.

Juni 1911.

1) Besser gesagt: „geführt hätte“. Das Tier wurde ja, wie oben gesagt, getötet.  
K. R.

*Nachdruck verboten.*

## Immunisation durch mündliche Verabreichung normaler Nervensubstanz gegen Virusinfektion ab ingestis und nachfolgende subkutane Infektion mit Strassen- und fixem Virus.

Von Prof. **Claudio Fermi**,

Vorstand d. kgl. hygienischen und antirabischen Institutes zu Sassari.

Bei meiner ersten Arbeit über Rattenimmunisierung durch Ingestion tollwütiger Nervensubstanz kam ich zu folgenden Schlüssen:

1) Die Wutsubstanzaufnahme vermag gegen subkutane Straßenvirusinfektion zu immunisieren. Unter 81 Ratten, welche 30, 26, 20 oder auch nur 10 Tage behandelt, dann mit Straßenvirus geimpft wurden, konnten 89 Proz. gerettet werden, und zwar 100:100 unter den 30 Tage, 46:100 unter den 20—26 Tage, 31:100 unter den 10 Tage hindurch mit Wutsubstanz ernährten. Nur 5 Tage lang ernährte (5) und Kontrollratten (22) gingen aus Wut zugrunde.

2) Die Impfung ab ingestis kann auch gegen subkutane Infektion fixen Virus immunisieren, solange sie 30 Tage fortgesetzt wird.

3) Negative Erfolge der Uebertragungsversuche von Tollwut auf diesem Wege dürften wohl durch diese Immunisationswirkung erklärt werden.

Diese Ergebnisse wurden auf Grund mehrerer Versuche von Dr. Repetto bestätigt, indem er schloß:

1) 100:100 der einen Monat hindurch mit fixem Virus ernährten Mäuschen starben an Wut.

2) Die durch Verabreichung von fixem Virus immunisierten Mäuse ertrugen eine nachfolgende Straßenvirusinfektion.

3) 9:10 der mit normaler Nervensubstanz ernährten Tiere ertrugen eine subkutane Straßenvirusinfektion, während die Kontrolltiere starben.

Ich trachtete nun, zu prüfen, ob die andauernde Einführung normaler Nervensubstanz Ratten auch gegen eine Infektion von fixem Virus zu immunisieren vermag.

Zu diesem Zwecke wurde 24 weißen Mäuschen<sup>1)</sup> täglich 1,5 g gesunde Lammhirnschubstanz 30 Tage hindurch, dann weitere 30 Tage dieselbe Menge frisches und virulentes fixes Kaninchenvirus täglich ver-

I. Versuch				II. Versuch			
Maus	Infektionsdatum	Paralyse	Tod	Maus	Infektionsdatum	Paralyse	Tod
1	21. 1. 1908	30. 1. 7 <sup>b</sup> Vm.	31. 1. 7 <sup>b</sup> Nm.	1	30. 4. 1911	14. 5. 7 <sup>b</sup> Nm.	12. 5. 7 <sup>b</sup> Vm.
2	dgl.	dgl.	dgl.	2	dgl.	14. 5. 7 <sup>b</sup> Vm.	14. 5. 7 <sup>b</sup> Nm.
3	"	2. 2. 7 <sup>b</sup> Vm.	2. 2. 7 <sup>b</sup> Nm.	3	"	16. 5. 7 <sup>b</sup> "	16. 5. 7 <sup>b</sup> "
4	"	dgl.	dgl.	4	"	19. 5. 7 <sup>b</sup> "	20. 5. 4 <sup>b</sup> "
5	"	4. 2. 7 <sup>b</sup> Vm.	5. 2. 4 <sup>b</sup> Nm.	5	"	25. 5. 7 <sup>b</sup> "	25. 5. 2 <sup>b</sup> "
6	"	5. 2. 7 <sup>b</sup> "	6. 2. 4 <sup>b</sup> "				
7	"	dgl.	dgl.				
8	"	10. 2. 7 <sup>b</sup> Vm.	10. 2. 7 <sup>b</sup> Nm.				
9	"	lebt					
10	"	"					

1) In zwei Versuchen; der erste fing den 21. Jan. 1908, der zweite den 14. März 1911 an.

abreicht; alle diese Mäuschen gediehen ganz flott weiter. Einige unter denselben Mäuschen überstanden auch eine nachträgliche Infektion mit fixem (12) resp. mit Straßenvirus (12) am Ende der Behandlung.

Zur Kontrolle wurden in beiden Versuchen 10, resp. 5 Mäuschen mit derselben Wutsubstanz ernährt.

Unter den 15 Kontrollmäuschen, welche Wutnervensubstanz direkt aufnehmen, starben 13, d. h. 77 Proz.

Außerdem wurde die Kraft des angewandten Virus geprüft:

I. Versuch					II. Versuch				
Maus	Infektionsdatum	Virus	Paralyse	Tod	Maus	Infektionsdatum	Virus	Paralyse	Tod
1	21. 1. 1908	fixes	26. 1. 7 <sup>h</sup> Vm.	27. 1. 7 <sup>h</sup> Vm.	1	14. 5. 1911	fixes	21. 5. 7 <sup>h</sup> Vm.	22. 5. 7 <sup>h</sup> Vm.
2	dgl.	"	dgl.	dgl.	2	dgl.	"	dgl.	dgl.
3	"	Straßen-	31. 1. 7 <sup>h</sup> Vm.	1. 2. 7 <sup>h</sup> Vm.	3	"	Straßen-	25. 5. 7 <sup>h</sup> Vm.	28. 5. 4 <sup>h</sup> Nm.
4	"	"	dgl.	dgl.	4	"	"	dgl.	dgl.

Alle mit Straßen- oder fixem Virus geimpften Kontrollen starben.

### Schlußfolgerung.

Durch Aufnahme normaler Nervensubstanz wurden alle Versuchstiere gegen eine Infektion ab ingestis immunisiert. Dieselben Tiere waren nach zweimonatlicher Ernährung mit normaler und tollwütiger Nervensubstanz auch gegen subkutane Impfung von Straßen-, sogar von fixem Virus immunisiert.

Es muß betont werden, daß diese Resultate bis dahin mit Mäuschen gewonnen wurden; sie beziehen sich daher nur auf diese Tiere.

*Nachdruck verboten.*

## Vergleich der Kraft konzentrierten und verdünnten Antiwut- und Impfstoffserums.

Von Prof. Dr. Claudio Fermi,

Vorstand d. kgl. hygienischen und antirabischen Institutes d. kgl. Universität Sassari.

In einer früheren Arbeit<sup>1)</sup>, wo ich mit verhältnismäßig schwachen Serummengen 27 Tiere (14 Kaninchen und 13 Hunde) prüfte, schloß ich in Einklang mit Marie, daß Antiwutserum für Mäuse sehr, für Hunde wenig, für Kaninchen kaum wirksam ist. Denn es rettete in einer Gabe von 0,5—2,5 ccm alle vor 84—95 Stunden infizierte Mäuse, während alle subdural oder subkutan infizierten Kaninchen trotz einer 24 resp. 5 Stunden, oder 30 Minuten oder auch gleich nach der Infektion angebrachten Impfung von 20 ccm Serum starben.

2 unter 4 Hunden überstanden die subkutane, 3 unter 8 die subdurale Infektion. Die ersteren hatten 20 ccm Serum in die Bauch-

1) Fermi, Cl., Sul diverso potere immunizzante di vaccini e sieri antirabici secondo la specie dell'animale su la quale si provano. (Studii Sassaressi. Anno VI. Fascic. 3.)

höhle, die letzteren 2 ccm Serum, 1 resp. 5 oder 10 Stunden nach der Infektion subdural erhalten.

Um die Sache weiter zu erforschen, wurden folgende Versuche angestellt:

Infektionsdatum	Versuchstier	Impfungsdatum	Tägliche Impfungen	Pro Impfung ccm	Immunisationsstage	Im ganzen eingeimpft ccm	Behandlung	Ergebnis		
								Paralyse	Tod	
A. Impfstoffserum.										
1909										
26. 9.	Ratte	29. 9.	2	1	3	6	1 ccm Pferdeserum 72 Std. + 98 ccm Phenol 72 " + 10 ccm 1-proz. 84 " Virus, filtriert und 84 " geimpft nach der 96 " Infektion 96 "		lebt	
dgl.	dgl.	dgl.	2	1	3	6			"	
"	"	30. 9.	2	1	2	4			"	
"	"	dgl.	2	1	2	4			"	
"	"	1. 10.	2	1	1	2	Dasselbe Gemisch, 10 Tage geimpft vor der 10 " Infektion sofort "	7. 10. 7 <sup>a</sup> Vm.	7. 10. 4 <sup>a</sup> Nm.	
"	"	dgl.	2	1	1	2			6. 10. 6 <sup>a</sup> Nm.	7. 10. 7 <sup>a</sup> Vm.
"	"	dgl.	2	1	1	2			7. 10. 11 <sup>a</sup> Vm.	7. 10. 4 <sup>a</sup> Nm.
6. 10.	"	26. 9.	3	1	1	3			11. 10. 7 <sup>a</sup> "	11. 10. 6 <sup>a</sup> "
dgl.	"	dgl.	3	1	1	3		dgl.	dgl.	
26. 9.	"	"	3	1	1	3		1. 10. 11 <sup>a</sup> Vm.	1. 10. 6 <sup>a</sup> Nm.	
dgl.	"	"	3	1	1	3		dgl.	dgl.	
7. 10.	Kan.	7. 10.	2	2,5	8	40	1 ccm Pferdeserum + 1 g Virus + 98 ccm 1-proz. Phenol, filtriert und 5 Min. nach der Infektion ge- impft		lebt	
dgl.	dgl.	dgl.	2	2,5	8	40			"	
"	"	"	2	2,5	8	40			"	
3. 9.	"	3. 9.	2	2,5	8	40			"	
dgl.	"	dgl.	2	2,5	8	40		"	"	
"	"	"	2	2,5	8	40		"	"	
18. 9.	"	"	2	2,5	2	10	Dasselbe Gemisch, 15 Tage vor der Infektion geimpft	24. 9. 7 <sup>a</sup> Vm.	24. 9. 6 <sup>a</sup> Nm.	
dgl.	"	"	2	2,5	2	10			dgl.	dgl.
"	"	"	2	2,5	2	10			"	"
22. 10.	"	7. 10.	2	2,5	2	10			28. 10. 7 <sup>a</sup> Vm.	29. 10. 6 <sup>a</sup> Nm.
dgl.	"	dgl.	2	2,5	2	10		29. 10. 7 <sup>a</sup> "	dgl.	
"	"	"	2	2,5	2	10		dgl.	"	
10. 10.	Hund *	26. 9.	2	3	15	90	1 ccm Pferdeserum + 10 ccm 1-proz. Virus + 98 ccm 1-proz. Phenol, 15 Tage vor der Infektion geimpft		lebt	
dgl.	" *	dgl.	2	3	15	90			14. 10. 7 <sup>a</sup> Vm.	14. 10. 11 <sup>a</sup> Vm.
"	Kan. *	"	2	3	15	90			dgl.	dgl.
"	" *	"	2	3	15	90				lebt
B. Pferdeantiwutserum.										
18. 11.	Ratte	18. 11.	2	1	10	20	Unverdünntes Serum, 5 Min. nach der Infektion dgl. 72 Std.		lebt	
dgl.	dgl.	dgl.	2	1	10	20			"	
"	"	21. 11.	3	1	7	20			"	
"	"	dgl.	3	1	7	20			"	
"	"	22. 11.	3	1,25	6	20	" 84 "		"	
"	"	dgl.	3	1,25	6	20	" 84 "		"	
"	"	18. 11.	2	1	10	20	1-proz. Serum 5 Min.		"	
"	"	dgl.	2	1	10	20	dgl. 5 Min.		"	
"	"	21. 11.	3	1	7	20	" 72 Std.		"	
"	"	dgl.	3	1	7	20	" 72 "		"	
"	"	22. 11.	3	1,25	6	20	" 84 "		"	
"	"	dgl.	3	1,25	6	20	" 84 "		"	
21. 8.	Maus	25. 8.	2	0,5	2	2	" 84 "	27. 8. 7 <sup>a</sup> Vm.	27. 8. 7 <sup>a</sup> Nm.	
dgl.	dgl.	dgl.	2	0,5	2	2	" 84 "	dgl.	dgl.	
"	"	"	2	0,5	2	2	" 84 "		lebt	
"	"	"	2	0,5	2	2	" 84 "		"	
"	"	"	2	0,5	2	2	" 84 "		"	
"	"	26. 8.	2	0,5	1	1	" 96 "	27. 8. 7 <sup>a</sup> Vm.	28. 8. 7 <sup>a</sup> Nm.	
"	"	dgl.	2	0,5	1	1	" 96 "	dgl.	dgl.	
"	"	"	2	0,5	1	1	" 96 "		"	
"	"	"	2	0,5	1	1	" 96 "		lebt	
"	"	"	2	0,5	1	1	" 96 "		"	

Infektionsdatum	Versuchstier	Impfungsdatum	Tägliche Impfungen	Pro Impfung ccm	Immunisationsstage	Im ganzen eingeimpft ccm	Behandlung	Ergebnis	
								Paralyse	Tod
C. Konzentriertes Impfstoffserum.									
1909									
18. 11.	Ratte	18. 11.	2	1	10	20	} Gleiche Vol. Serum u. Impfstoff, 5 Min. n. d. Inf. geimpft 72 Std. nach der Inf. geimpft dgl. 84 Std. nach der Inf. geimpft dgl.		lebt
dgl.	dgl.	dgl.	2	1	10	20			"
"	"	21. 11.	3	1	7	9			"
"	"	dgl.	3	1	7	9			"
"	"	22. 11.	3	1,25	6	9			"
"	"	dgl.	3	1,25	6	9		25. 11. 7 <sup>h</sup> Nm.	26. 11. 7 <sup>h</sup> Vm. lebt
D. Verdünntes Impfstoffserum.									
18. 11.	Ratte	18. 11.	2	1	10	20	} 1 ccm Pferdeser. + 1 g Virus + 98 ccm 1-proz. Phenol, 5 Min. n. d. Inf. geimpft dgl. 72 Std. " 72 " " 84 " " 84 " Kontrolle		lebt
dgl.	dgl.	dgl.	2	1	10	20			"
"	"	21. 11.	3	1	7	20			"
"	"	dgl.	3	1	7	20			"
"	"	"	3	1,25	6	20			"
"	"	"	3	1,25	6	20		"	
"	"	"	—	—	—	—		25. 11. 7 <sup>h</sup> Vm.	26. 11. 7 <sup>h</sup> Vm.
"	"	—	—	—	—	—	"	dgl.	dgl.

**Erste Reihe.**

1) Es wurde die Kraft 1-proz. Antiwutserums auf Ratten und Mäuschen verschiedene Zeit nach der Infektion geprüft.

2) Es wurde die Kraft von Impfstoffserum in verschiedenen Gaben auf Ratten, Kaninchen und Hunden geprüft.

Die Infektion geschah in allen Fällen mit fixem Virus auf subkutanem Wege; nur bei 4 mit einem Sternchen vermerkten Versuchen wurde das Virus subokular eingeimpft.

Aus dieser mit 62 Tieren (36 Ratten, 10 Mäuschen, 14 Kaninchen und 2 Hunden) ausgeführten Versuchsreihe ergibt sich folgendes:

1) 20 ccm 1-proz. Antiwutserum retteten alle mit fixem Virus 5 Minuten nach, ebenso wie 72, resp. 84 Stunden vor der Behandlung subkutan infizierte Ratten.

2) 2 ccm 1-proz. Serum retteten 3 unter den fünf 84 Stunden, 2 unter den fünf 96 Stunden nach der subkutanen Infektion behandelten Mäuschen.

3) Ein Gemisch aus gleichen Teilen Impfstoff und Antiserum zeigte sich ebenfalls recht wirksam, denn es rettete bei einer Gabe von 20 ccm 5 unter den sechs 5 Minuten vor, ebenso wie 72—84 Stunden nach der Behandlung subkutan infizierten Ratten. Die verendete Ratte war vor 84 Stunden infiziert worden.

4) 1-proz. Impfstoffserum in einer Gabe von 20 ccm rettete alle vor 72, resp. 84 Stunden infizierte Ratten.

5) Beinahe der gleiche Erfolg wurde durch Impfung von 4—6 ccm Impfstoffserum erzielt, indem 3 unter den 4 vor 72—84 Stunden infizierten Ratten überlebten. Es starben die vor 96 Stunden infizierten und mit nur 2 ccm Impfstoffserum behandelten Ratten.

6) Völlig unwirksam waren 3 ccm 1-proz., 5 Minuten und 10 Tage nach der subkutanen Infektion geimpftes Impfstoffserum.

7) 1-proz. Impfstoffserum in einer Gabe von 40 ccm (täglich 5 ccm) rettete alle vor 5 Minuten subkutan infizierte Kaninchen.



8) 1-proz. Impfstoffserum in einer Gabe von 10 ccm (täglich 5 ccm) rettete kein vor 15 Tagen subkutan infiziertes Kaninchen.

9) Dasselbe Impfstoffserum in einer Gabe von 90 ccm (täglich 5 ccm) rettete eine Hälfte der nach weiteren 15 Tagen im Auge infizierten Kaninchen und Hunde.

#### Zweite Reihe.

I. Vergleich der Immunkraft von Antiwutserum, von konzentriertem und verdünntem Impfstoffserum bei vor 5 Minuten mit fixem Virus subkutan infizierten Kaninchen, Meerschweinchen und Hunden. Täglich wurden 5 ccm in zwei Gaben verabreicht; die Immunisation dauerte 8 Tage, im ganzen also 40 ccm Immunflüssigkeit eingepflegt.

Infektions- datum	Impfungs- datum	Zahl der Versuchs- tiere	Behandlung	Ergebnis	
				Paralyse	Tod
a) Kaninchen					
15. 12.	15. 12.	1	Antiwutserum	23. 12. 7 <sup>h</sup> Vm.	23. 12. 6 <sup>h</sup> Nm.
dgl.	dgl.	3	"	leben	
17. 12.	17. 12.	2	"	"	
dgl.	dgl.	2	konzentr. Impfstoffserum	"	
"	"	2	verdünntes "	"	
"	—	1	Kontrolle	22. 2. 7 <sup>h</sup> Vm.	23. 2. 5 <sup>h</sup> Nm.
b) Meerschweinchen					
17. 2.	17. 2.	3	Serum	leben	
dgl.	dgl.	3	konzentr. Impfstoffserum	"	
"	"	3	verdünntes "	"	
"	—	1	Kontrolle	22. 2. 7 <sup>h</sup> Nm.	23. 2. 2 <sup>h</sup> Nm.
c) Hunde					
17. 2.	17. 2.	2	Serum	leben	
dgl.	dgl.	2	konzentr. Impfstoffserum	"	
"	"	2	verdünntes "	"	
"	—	2	Kontrolle	22. 2. 7 <sup>h</sup> Vm.	23. 2. 5 <sup>h</sup> Nm.

II. Vergleich von konzentriertem und verdünntem Impfstoffserum, unter Anwendung der vor 5 Minuten subkutan infizierten Kaninchen. Täglich wurden zwei Impfungen ausgeführt.

Infektionsdatum	Impfungsdatum	Zahl der Versuchstiere	Im ganzen eingepflegt	Behandlung	Ergebnis	
					Paralyse	Tod
15. 12.	15. 12.	3	40 ccm	Gleiche Raumteile, Impfstoff und Antiserum	leben	
dgl.	dgl.	1	40 "	dgl.	23. 12. 7 <sup>h</sup> Nm.	24. 12. 7 <sup>h</sup> Nm.
26. 11.	26. 11.	2	100 "	"	leben	
15. 12.	—	3	—	Kontrolle	20. 12. 7 <sup>h</sup> Vm.	24. 12. 7 <sup>h</sup> Vm.
dgl.	15. 12.	1	40 "	1-proz. Impfstoffserum	23. 12. 7 <sup>h</sup> Vm.	23. 12. 6 <sup>h</sup> Nm.
"	"	3	40 "	dgl.	leben	
26. 11.	26. 11.	1	70 "	"	1. 12. 7 <sup>h</sup> Vm.	3. 12. 7 <sup>h</sup> Vm.
dgl.	dgl.	3	100 "	"	leben	
29. 1.	29. 1.	1	30 "	verdünntes Impfstoffserum	2. 2. 7 <sup>h</sup> Vm.	2. 2. 12 <sup>h</sup> Vm.
dgl.	dgl.	2	30 "	dgl.	3. 2. 7 <sup>h</sup> "	3. 2. 9 <sup>h</sup> "
"	"	1	30 "	"	4. 2. 7 <sup>h</sup> "	4. 2. 11 <sup>h</sup> "
26. 11.	—	1	—	Kontrolle	2. 12. 7 <sup>h</sup> "	3. 12. 7 <sup>h</sup> "

Aus dieser zweiten Versuchsreihe mit 113 Versuchstieren (14 Ratten, 17 Hunden, 66 Kaninchen, 16 Meerschweinchen) ergibt sich folgendes:

1) Antiwutserum war ebenso wirksam wie konzentriertes und verdünntes Impfstoffserum; sie retteten 89 Proz. der mit 40 ccm Immunflüssigkeit behandelten Tiere (33 Kaninchen, 10 Meerschweinchen, 8 Hunde).

III. Die Immunisation betraf subokular infizierte Tiere. Im ganzen wurden 40 ccm Immunflüssigkeit verabreicht.

Infektions- datum	Impfungs- datum	Zahl der Versuchs- tiere	Behandlung	Ergebnis	
				Paralyse	Tod
Kaninchen					
4. 3.	4. 3.	2	Antiserum	9. 3. 7 <sup>h</sup> Nm.	10. 3. 4 <sup>h</sup> Nm.
dgl.	dgl.	2	konzentr. Impfstoffserum	dgl.	dgl.
„	„	2	verdünntes „	„	10. 3. 7 <sup>h</sup> Nm.
Meerschweinchen					
4. 3.	4. 3.	2	Antiserum	11. 3. 7 <sup>h</sup> Vm.	11. 3. 6 <sup>h</sup> Nm.
dgl.	dgl.	2	konzentr. Impfstoffserum	dgl.	dgl.
„	„	2	verdünntes „	8. 3. 7 <sup>h</sup> Vm.	8. 3. 7 <sup>h</sup> Nm.
Hunde					
6. 3.	6. 3.	1	Antiserum	lebt	
dgl.	dgl.	1	konzentr. Impfstoffserum		
„	„	1	verdünntes „	8. 3. 7 <sup>h</sup> Vm.	8. 3. 7 <sup>h</sup> Nm.

IV. Ferner wurden die bereits geretteten Kaninchen der Versuchsreihe II einer subokularen Infektion wiederum unterworfen.

Infektionsdatum	Impfungsdatum	Zahl der Versuchstiere	Im ganzen eingepft	Vorbehandlung	Ergebnis	
					Paralyse	Tod
28. 12.	15. 12.	1	40 ccm	Antiserum	23. 12. 7 <sup>h</sup> Vm.	23. 11. 7 <sup>h</sup> Nm.
dgl.	dgl.	3	40 "	"	1. 1. 7 <sup>h</sup> "	1. 1. 7 <sup>h</sup> "
"	"	4	40 "	konzentr. Impfstoffserum	dgl.	dgl.
"	"	1	100 "	"	14. 1. 4 <sup>h</sup> Nm.	15. 1. 8 <sup>h</sup> Vm.
"	"	1	100 "	"	(gestorben 18. 7. zu spät)	
"	"	1	40 "	verdünntes "	23. 12. 7 <sup>h</sup> Vm.	23. 12. 6 <sup>h</sup> Nm.
"	"	3	40 "	"	1. 1. 7 <sup>h</sup> "	1. 1. 7 <sup>h</sup> "
"	"	3	100 "	"	1. 1. 7 <sup>h</sup> "	2. 1. 7 <sup>h</sup> Vm.

während alle mit 30 ccm behandelten Tiere abstarben. Kein Unterschied wurde im Verhalten der einzelnen Arten beobachtet.

2) Antiwutserum verhielt sich bei einer Verabreichung von 40 ccm (täglich 5 ccm in zwei Impfungen) vom Impfstoffserumgemisch nur wenig verschieden. Alle behandelten Tiere überlebten. Es starben 1 der 6 mit Antiwutserum, 1 der 6 mit konzentriertem, 2 der 8 mit verdünntem Impfstoffgemisch behandelten Tiere; außerdem gingen alle mit nur 2 ccm Impfstoffserum behandelten Kaninchen zugrunde. Alle Kontrolltiere starben an Tollwut.

3) Die gleichen Impfflüssigkeiten in der gleichen Gabe waren nach einer subduralen Infektion von fixem Virus bei Kaninchen und Meerschweinchen machtlos, retteten aber 2 unter 3 Hunden.

4) 15 nach subkutaner Infektion mittelst Impfung von 10—100 ccm Serum gerettete Kaninchen gingen bei darauffolgender endokularer Impfung zugrunde; nur 2 unter den 3 mit 100 ccm 1-proz. Impfstoffserum behandelten Kaninchen blieben am Leben.

5) 30—60 Tage hindurch bis zu einer Gesamtmenge von 180—300 ccm verabreichtes Impfstoffserum rettete weder 10 Ratten, noch 4 Hunde, die mit fixem oder Straßenvirus gleich oder 20 Tage nach Abschluß der Immunisation infiziert worden waren.

6) 300 ccm konzentriertes oder verdünntes Impfstoffgemisch innerhalb 30—60 Tage verabreicht retteten weder 4 Ratten, noch 10 Kaninchen, noch 2 Hunde, die gleich oder 20 Tage nach dem Abschluß der Immuni-

V. Wirkung von auf verschiedenem Wege geimpftem Impfstoffe und Impfstoffserum auf subdural infizierte Ratten, Kaninchen und Hunde. Täglich wurden zwei Impfungen ausgeführt. Meistens wurde eine Hälfte der Versuchstiere mit fixem, die andere mit Straßenvirus infiziert.

Impfungs- datum	Impfungs- tage	Auf einmal geimpft ccm	Im ganzen geimpft ccm	Zahl u. Art d. Versuchstiere	Vorbehandlung	Infektions- datum	Ergebnis	
							Paralyse	Tod
A. Impfstoff. Ratten.								
9. 10.	60	1,5	180	2	Phenolimpfstoff: 30 Tage dann 15 Tage in Ruhe gelassen, darauf 30 Tage hindurch Impfstoff, dann Infektion	12. 1.	17. 1. 7 <sup>a</sup> Vm.	20. 1. 7 <sup>a</sup> Vm.
dgl.	60	1,5	180	2		dgl.	27. 1. 7 <sup>a</sup> „	29. 1. 7 <sup>a</sup> „
„	60	1,5	180	1		„	17. 1. 7 <sup>a</sup> „	20. 1. 7 <sup>a</sup> „
„	60	1,5	180	1	Kontrolle	„	27. 1. 7 <sup>a</sup> Vm.	29. 1. 7 <sup>a</sup> „
13. 11.	60	0,5	60	1	Phenolimpfstoff: 60 Tage, darauf Infektion sofort	13. 1.	17. 1. 4 <sup>a</sup> Nm.	18. 1. 8 <sup>a</sup> „
dgl.	60	0,5	60	1	Phenolimpfstoff: 60 Tage, Infektion nach weiteren 20 Tagen	dgl.	dgl.	dgl.
„	60	0,5	60	1		2. 2.	11. 2. 7 <sup>a</sup> Vm.	12. 2. 7 <sup>a</sup> Vm.
„	60	0,5	60	1		„	„	„
Hunde.								
13. 11.	60	2,5	300	2	Impfstoff: 60 Tage	12. 1.	27. 1. 1 <sup>a</sup> Nm.	29. 1. 7 <sup>a</sup> Nm.
9. 10.	60	2,5	300	1	Phenolimpfstoff: 30 Tage, dann 15 Tage in Ruhe gelassen, darauf 30 Tage hindurch Impfstoff, dann Infektion	28. 12.	5. 1. 7 <sup>a</sup> Vm.	7. 1. 9 <sup>a</sup> „
dgl.	60	2,5	300	1		dgl.	9. 1. 7 <sup>a</sup> „	10. 1. 7 <sup>a</sup> Vm.
B. Impfstoffserum. Ratten.								
13. 11.	60	0,5	60	1	gleiche Raumteile Serum und Impfstoff, zwei Tiere gleich, die übrigen 20 Tage nach d. Impfung infiziert	13. 1.	17. 1. 4 <sup>a</sup> Nm.	18. 1. 8 <sup>a</sup> Vm.
dgl.	60	0,5	60	1		dgl.	dgl.	dgl.
„	60	0,5	60	2		2. 3.	11. 2. 7 <sup>a</sup> Vm.	12. 2. 7 <sup>a</sup> Nm.
Kaninchen.								
13. 11.	6	2,5	30	1	30 ccm konzentriertes Impf- stoffserum	29. 1.	4. 2. 7 <sup>a</sup> Vm.	4. 2. 11 <sup>a</sup> Nm.
dgl.	6	2,5	30	1	dgl.	dgl.	5. 2. 7 <sup>a</sup> „	6. 2. 10 <sup>a</sup> „
„	6	2,5	30	1	„	„	6. 2. 7 <sup>a</sup> „	dgl. „
„	6	2,5	30	1	„	„	7. 2. 7 <sup>a</sup> „	7. 2. 3 <sup>a</sup> Nm.
„	6	2,5	30	1	„	2. 2.	6. 2. 7 <sup>a</sup> „	6. 2. 10 <sup>a</sup> Vm.
„	6	2,5	30	1	„	dgl.	7. 2. 7 <sup>a</sup> „	7. 2. 3 <sup>a</sup> Nm.
„	6	2,5	30	1	„	„	8. 2. 7 <sup>a</sup> „	8. 2. 11 <sup>a</sup> Vm.
„	6	2,5	30	3	„	„	11. 2. 7 <sup>a</sup> „	11. 2. 10 <sup>a</sup> „
Hunde.								
13. 11.	60	2,5	300	1	Verdünntes Impfstoff- serum: 30 Tage 1 g f. V. subkutan, gleich zu Anfang der Paralyse impft man weitere 10 ccm Impf- stoffserum in drei Tagen	13. 1.	18. 1. 7 <sup>a</sup> Nm.	21. 1. 7 <sup>a</sup> Nm.
dgl.	60	2,5	300	1		dgl.	dgl.	dgl.

sation subdural geimpft wurden und sogar 10 ccm Impfstoffserum in 3 Tagen nach Beginn der Paralyse subdural erhalten hatten.

#### Schlußfolgerungen.

1) Antiwutserum und das Gemisch aus Impfstoff und Antiserum des antirabischen Institutes zu Sassari sind gegen die schwersten In-

fektionen des stärksten unter den bekannten fixen Virus recht wirksam, denn alle subkutan infizierten Tiere (Mäuschen, Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen, Hunde) überstanden die Infektion nach einer Behandlung mit 3 resp. 10 oder 40 ccm Serum oder Impfstoffserumgemisch, während alle Kontrollen starben.

2) Kein Unterschied konnte zwischen Antiwutserum und konzentriertem resp. 1-proz. Impfstoffserumgemisch festgestellt werden.

*Nachdruck verboten.*

## Wirkung des Sonnenlichtes auf das Antiwutserum.

Von Prof. Dr. Claudio Fermi,

Vorstand des Kgl. hygienischen und antirabischen Institutes zu Sassari.

Als Vorversuch zu anderweitigen Forschungen hatte ich die Wirkung der Sonnenstrahlen auf die Wirksamkeit des antirabischen Serums und

### 1. Antiwutserum.

In-fektions-datum	Versuchs-tiere	Behandlung	In-jektions-datum	Be-hand-lungs-tage	Im ganzen verab-reicht	Ergebnis	
						Paralyse	Tod
23. Febr.	2 Mäusen	100 Stunden bestrahltes, nach 48 Stunden injiziertes Serum	25. Febr.	4	2 ccm	1. März 7 Uhr vorm.	2. März 7 Uhr vorm.
dgl.	dgl.	Dasselbe, nach 72 Stunden geimpft	26. „	3	1,5 „	dgl.	dgl.
„	„	Dasselbe, nach 84 Stunden geimpft	27. „	1	0,5 „	„	„
„	„	Serum unbestrahlt, nach 72 Stunden injiziert	26. „	3	1,5 „	leben	
„	„	Dasselbe, nach 84 Stunden geimpft	27. „	1	0,5 „	„	
18. Febr.	„	Serum 50 Stunden bestrahlt; Injektion nach 48 Stunden	21. „	4	2 „	27. Febr. 7 Uhr vorm.	28. Febr. 7 Uhr vorm.
dgl.	„	Dasselbe, nach 72 Stunden geimpft	22. „	3	1,5 „	dgl.	dgl.
„	„	Dasselbe, nach 84 Stunden geimpft	23. „	1	0,5 „	„	„
„	„	Serum unbestrahlt; Injektion nach 72 Std.	22. „	3	1,5 „	leben	
„	„	Dasselbe, nach 84 Stunden geimpft	23. „	1	0,5 „	„	
24. März	„	Serum 10 Stunden bestrahlt; Injektion nach 5 Minuten	24. März	5	2,5 „	„	
dgl.	„	Dasselbe, nach 24 Stunden geimpft	25. „	4	2,5 „	„	
26. März	„	Serum 50 Stunden bestrahlt; Injektion nach 5 Minuten	26. „	5	2 „	„	
dgl.	„	Dasselbe, nach 24 Stunden geimpft	27. „	4	2 „	„	
25. März	„	Serum unbestrahlt; Injektion nach 5 Minuten	25. „	5	2,5 „	„	
dgl.	„	Dasselbe, nach 24 Stunden geimpft	26. „	4	2 „	„	

Impfstoffes zu prüfen. Dazu dienten weiße Mäuschen, welche mit fixem Virus, und Ratten, welche mit Straßenvirus subkutan infiziert wurden, dann mit bestrahltem resp. unbestrahltem Pferdeimmunserum und Impfstoff immunisiert wurden. Täglich wurde 0,5 ccm den Mäuschen, 2 ccm den Ratten in zwei Gaben verabreicht.

## 2. Antiwutimpfstoff.

In-fektions-datum	Versuchs-tiere	Behandlung	In-jektions-datum	Be-hand-lungs-tage	Im ganzen verab-reicht	Ergebnis	
						Paralyse	Tod
19. Juli 1911	3 Ratten	Fermischer Impfstoff, 2 Tage bestrahlt; Temp. 27° C*)	20 Juli	15	30 ccm	leben	
dgl.	1 Ratte	Derselbe, 4 Tage bestrahlt; Temp. 29° C	dgl.	„	dgl.	6. Aug. 7 Uhr vorm.	7. Aug. 12 Uhr mitt.
„	2 Ratten	Derselbe, 6 Tage bestrahlt; Temp. 27—29° C	„	„	„	leben	
„	1 Ratte					12. Aug. 7 Uhr vorm.	12. Aug. 4 Uhr nachm.
„	2 Ratten	Derselbe, 8 Tage bestrahlt; Temp. 27—29° C	„	„	„	leben	
„	2 Ratten					18. Aug. 7 Uhr vorm.	19. Aug. 7 Uhr vorm.
„	1 Ratte	Kontrollen	—	—	—	lebt	
„	3 Ratten					4. Aug. 7 Uhr vorm.	4. Aug. 7 Uhr nachm.

\*) Mittels eines Aktinothermometers gemessen.

## Ergebnis.

1) Antiwutserum aus Pferd war nach 50-stündiger Sonnenbestrahlung auf vor 84, 72 oder auch nur 48 Stunden mit fixem Virus geimpfte Mäuschen völlig unwirksam, es behielt aber seine Kraft nach 10- oder auch 50-stündiger Bestrahlung bei, wenn die Mäuse nur 5 Min. bis 24 Stunden vorher geimpft worden waren.

2) Nach 2-tägiger Exposition dem direkten Sonnenlichte bei einer Temperatur von 27—29° C hat Antiwutimpfstoff seine volle Wirksamkeit beibehalten; eine 4—6-tägige Exposition setzte seine Immunisationskraft schon ziemlich herab, denn es wurden mit Hirn nur  $\frac{2}{3}$  der infizierten Ratten gerettet; nach 8-tägiger Bestrahlung hatte er seine Kraft beinahe ganz verloren, denn es wurden mit Hirn nur  $\frac{1}{3}$  der infizierten Ratten gerettet.

*Nachdruck verboten.*

## Zur Tuberkelbacillenfärbung.

Von Dr. F. Berka, Prosektor am allg. Krankenhause, Olmütz.

In diesem Centralbl. Abt. I. Orig. Bd. 60. p. 601 bespricht Herman im Artikel „Sur la coloration du bacille tuberculeux“ meine in derselben Zeitschrift. Bd. 51. p. 456 erschienene Publikation „Ueber das Verhältnis der zur Darstellung gelangenden Tuberkelbacillen bei Sputumfärbemethoden“, insbesondere deren Schlüsse (daß für die Anzahl der mit den gebräuchlichen Sputumfärbemethoden dargestellten Tuberkelbacillen hauptsächlich die Entfärbungsprozedur maßgebend sei; außerdem

daß einzelne Farben, namentlich die der Violettgruppe, die Tuberkelbacillen besser zu tingieren scheinen).

Wenn H. sich mit der ersten Angabe nicht einverstanden erklären zu können glaubt, muß ich nochmals auf die von mir (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 51. p. 458) angeführten Versuche mit Umfärbungen bei steigendem Säuregrad des Entfärbungsmittels hinweisen, die man jederzeit überall anzustellen in der Lage ist; man kann sich dabei stets überzeugen, daß bei Entfärbung mit schwächerer Säure die Zahl der dargestellten Bacillen steigt. Dies gilt selbst für seine Methode, deren besondere Brauchbarkeit ich hervorgehoben habe, bei welcher oft schon ein kurzes Verweilen in seiner Entfärbungsflüssigkeit ein Verblässen der Bacillenleiber zur Folge hat, wo nachher man durch nochmalige Wiederholung der ganzen Prozedur mit nur momentanem Eintauchen in die Säure Abhilfe schafft.

*Nachdruck verboten.*

## „Säurefest“ und „Antiforminfest“.

### Kritisches zu diesen beiden Begriffen.

Von Dr. W. Knoll, Arzt, Frauenfeld i. d. Schweiz.

Die beiden im Titel genannten Eigenschaften des Tuberkulosevirus sind heute in aller Munde. Wenn ich mir erlaube, an ihnen eine Kritik zu üben, so geschieht es deshalb, weil die beiden Begriffe meines Erachtens öfters in einen Zusammenhang miteinander gebracht werden, der in Wirklichkeit nicht existiert.

Askanazy sagt in Aschoffs Lehrb. d. path. Anat., 1. Teil: „Alle so zahlreichen Verfahren zur Färbung der Tuberkelbacillen beruhen auf dem Prinzip, daß diese Bacillen sich nur langsam mit den Farbstoffen verbinden (daher wählt man intensiv färbende Lösungen, wie Karbol-fuchsin usw.), aber sich dann nach der Färbung selbst bei Behandlung mit Alkohol und Säuren, z. B. 25-proz. Mineralsäuren, nicht so bald entfärben. Daher nennt man sie säurefest. Diese Säurefestigkeit beruht mindestens zum großen Teil auf dem reichlichen Gehalt der Bacillen an fettartigen Substanzen, an Wachsen“<sup>1)</sup>.

Aus dieser Definition geht hervor, daß die Eigenschaft der „Säurefestigkeit“ eine solche rein farbchemischer Art ist, aus der durchaus nicht ohne weiteres ein Schluß auf eine biologische Eigenschaft, nämlich die Resistenz gegen Säureeinwirkung, abgeleitet werden darf. Aus einer farbchemischen Tatsache kann nicht bindend auf einen biologisch-chemischen Vorgang geschlossen werden, weil es sich im ersteren Falle stets um abgetötete, im zweiten stets um lebende Individuen handelt.

Ein Analogon der farbchemischen „Säurefestigkeit“ ist die „Alkalifestigkeit“ der Tuberkelbacillen, wie sie von Gasis<sup>2)</sup> als typisch für den Tuberkelbacillus im Gegensatz zum Smegmabacillus beschrieben ist, wie sie übrigens schon von früheren Autoren [Müller<sup>3)</sup>, Rondelli

1) Vgl. dagegen Deycke, München. med. Wochenschr. 1910. p. 633 ff.

2) Gasis, Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Orig. Bd. 50. p. 111 f.

3) Müller, A., Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Orig. Bd. 29. p. 791.



und Buscalioni<sup>1)</sup>] praktisch für die Färbung durchgeführt worden war. Auch sie ist eine farbchemische Reaktion, eine farbchemische Alkalifestigkeit, festgestellt an totem Material.

Die Antiforminfestigkeit der verschiedenen Formen des Tuberkulosevirus und, wie ich hier ganz besonders betonen möchte — auch der Muchschen granulären Form ist dagegen eine biologische Eigenschaft auf chemischer Grundlage, da wir bekanntlich imstande sind, durch den Tierversuch die Virulenz und damit das Leben des vorher mit Antiformin behandelten Tuberkulosevirus nachzuweisen.

Dabei haben wir uns die Wirkung des Gemisches von NaOH und NaOCl auf organische Körper einmal als die einer starken Base und dann als die einer Oxydation durch den freiwerdenden Sauerstoff vorzustellen.

Das biologische Analogon — allerdings in chemisch abgeschwächtem Maße — ist die Einwirkung des HCl bei der Magensaftverdauung tuberkulösen Materials, der gegenüber das Stäbchen seine Lebensfähigkeit schon längst erwiesen hat, wodurch auch mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit die Lebensfähigkeit der Muchschen Körner miterwiesen ist, weil das Stäbchen solche auch in einem Entwicklungsstadium in der größten Mehrzahl der Individuen enthält, da sein Leib sich mit Karbolfuchsin bleibend färbt<sup>2)</sup>).

Die beiden Begriffe der Säurefestigkeit im farbchemischen und der Antiforminfestigkeit in biologischem Sinne sollten deshalb nie als gleichwertig nebeneinander gebraucht werden. Es entstehen daraus Konsequenzen bezüglich der biologischen Rolle der granulären Form, die uns die Wahrheit verhüllen, anstatt sie uns zu zeigen.

Kommt dazu der Umstand, daß sich in letzter Zeit, soweit es mir selbst möglich ist, die bezügliche Literatur zu übersehen, die Auffassung geltend macht, den ursprünglich weiter gefaßten farbchemischen Begriff der „Säurefestigkeit“ auf die mit Karbolfuchsin arbeitenden Methoden einzuengen.

Diese Tendenz hat auch Much dazu geführt, seine granuläre Form für nicht säurefest zu erklären, wiewohl sie durch eine verschärfte und wenigstens bei seiner zweiten Modifikation durch Anwendung zweier Mineralsäuren (HNO<sub>3</sub> und HCl) verschärfte Gram-Methode noch dargestellt werden kann, während der sonst bei der gewöhnlichen Gram-Färbung „säurefeste“ Leib bei diesem Verfahren seinen Farbstoff abgibt<sup>3)</sup>).

Much übertrug in der Folge diese mangelnde „Säurefestigkeit“ im Färbeverfahren auch auf das biologische Verhalten seiner granulären Form, indem er sie als gegenüber chemischen Einwirkungen weniger widerstandsfähig erklärte als den „säurefesten“ Bacillus und damit ein Argument zu seiner Ablehnung der Sporennatur der Körnchen gewann. Auch Deycke macht diese Uebertragung, wenn

1) Rondelli, A., u. Buscalioni, L., Ref. Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Bd. 21. p. 70.

2) Wehrli u. Knoll, Brauers Beiträge. Bd. 14. 1909. H. 2. Dort auch der Beweis dafür, daß die Muchsche Färbung die nach Ziehl färbbaren Bacillen in völlig identischer Weise darstellt, wie die Muchsche granuläre Stäbchenform.

3) Vgl. dazu die Umfärbungen in der Arbeit von Wehrli und Knoll, l. c. und der Dissert. von Joh. Adam, Leipzig 1910.

er einerseits bestätigt, daß die granuläre Form gleichfalls von Antiformin nicht angegriffen werde und hinzufügt: „Und doch sind die Granula nicht säurefest“<sup>1)</sup>. Dieselbe Auffassung findet sich jüngst noch bei Fraenkel und Much bezüglich ihrer Befunde bei der Lymphomatosi granulomatosa (Hodgkinsschen Krankheit), deren granuläre Stäbchen „dem Tuberkulosevirus zum mindesten sehr nahe“ stehen sollen<sup>2)</sup>. Eine solche Auffassung entspricht aus den oben angeführten Gründen nicht den Tatsachen, indem sie einer gedanklichen Gleichstellung zweier, ihrer Natur nach ungleichartiger und darum auch nicht direkt miteinander vergleichbarer Begriffe entspringt.

Daß der Begriff der „Säurefestigkeit“ ein rein farbchemischer ist, geht meines Erachtens einwandfrei aus der oben angeführten Arbeit von Deycke hervor, weil er bewies, daß die Fettsäuren als chemisch wohl charakterisierte Körper auch außer Zusammenhang mit dem Organismus des Tuberkelbacillus die spezifische chemische Eigenschaft besitzen, Karbolfuchsin festzuhalten bei folgender Behandlung mit Mineralsäuren, daß sie also der engeren Fassung des Begriffes „säurefest“ Genüge leisten.

Miteinander direkt vergleichbar und damit für unsere Auffassung von derselben Dignität sind nur die farbchemische Säurefestigkeit im ursprünglichen weiteren und im heutigen engeren Sinne des Begriffes und die ebenfalls farbchemische Alkalifestigkeit, wie sie Gasis<sup>3)</sup> präzisierte, einerseits; die Antiforminfestigkeit = Resistenz des lebenden Organismus gegen Einwirkung einer starken Base und Oxydation und die Resistenz desselben Organismus gegen Säureeinwirkung beispielsweise beim Magenverdauungsversuche als biologische Methoden andererseits. Dagegen geht es nicht an, ein Glied der einen Gruppe mit dem Gegengliede der anderen in direkte Parallele zu setzen.

Nach meiner heutigen Ansicht müssen wir uns über diese chemischen Tatsachen Rechenschaft geben, wenn wir den einzelnen Wuchsformen des Tuberkulosevirus, ganz besonders aber der granulären Form, die ihr zukommende biologische Stellung im System geben wollen.

Frauenfeld, 15. September 1911.

*Nachdruck verboten.*

## Bemerkung zur Schnelldiagnose des Rotzes.

Von Dr. M. Müller.

In seiner Abhandlung „Schnelldiagnose des Rotzes mit Hilfe der Komplementbindungsmethode“ (diese Zeitschr. Bd. 60. p. 327) weist Prof. Miessner eingangs darauf hin, daß die Serodiagnose des Rotzes möglichst schnell und sicher gestellt werden müsse, und schreibt dann:

„Mit Rücksicht hierauf wurde seinerzeit von mir ein Schnellagglutinationsverfahren mit Hilfe der Zentrifuge ermittelt, welches gestattete,

1) l. c. p. 635, 1. Spalte oben.

2) Fraenkel u. Much, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 67. 1910. H. 2.

3) l. c.

das Ergebnis der Agglutination nicht wie bisher erst nach 36 bzw. 48 Stunden festzustellen, sondern schon innerhalb 1 Stunde. Zu gleichen Ergebnissen kam damals auch Pfeiler am Pathologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule zu Berlin.“

Hierzu muß ich bemerken, daß das Schnellagglutinationsverfahren für Rotz nicht von Prof. Miessner ermittelt, sondern zuerst von mir angewendet und auch zuerst bekannt gegeben worden ist<sup>1)</sup>. Ich habe Herrn Prof. Miessner bereits im Archiv für praktische und wissenschaftliche Tierheilkunde. Bd. 35 darauf hingewiesen, daß ich das Verfahren bereits im Jahre 1906 praktisch bei der Stellung der Rotzdiagnose im Hygienischen Institut der Universität Straßburg angewendet habe, und zwar unmittelbar nachdem Gaehstgens als erster das Zentrifugieren zur Beschleunigung der Typhusagglutination im gleichen Institut praktisch verwertet hat. Das Uebertragen des Zentrifugierens als Beschleunigungsmittel von der Typhusagglutination auf die Rotzagglutination war daher für mich bei einer gemeinsamen Tätigkeit mit Gaehstgens geradezu etwas Selbstverständliches. Wenn ich mich erst 2 Jahre später zu einer Mitteilung hierüber entschlossen habe, so geschah dies infolge des Umstandes, daß das Verfahren bis dahin anderwärts — insbesondere auch Herrn Prof. Miessner — für die Beschleunigung der Rotzdiagnose unbekannt geblieben ist.

Ich würde den erneuten Hinweis auf meine Priorität in dieser Frage für überflüssig erachten, wenn nicht die Miessnerschen Angaben hierzu herausgefordert hätten.

München, 5. Oktober 1911.

1) Müller, M., Beitrag zur Agglutinationstechnik bei Rotz. (Berlin. tierärztl. Wochenschr. 1908. p. 595.)

---

**Die Herren Mitarbeiter werden höflichst gebeten, bereits fertiggestellte Klischees — falls solche mit den Manuskripten abgeliefert werden — nicht der Redaktion, sondern direkt der Verlagshandlung Gustav Fischer in Jena einzusenden.**

---

### Inhalt.

**Berka, F.**, Zur Tuberkelbacillenfärbung, p. 604.

**Fermi, Claudio**, Immunisation durch mündliche Verabreichung normaler Nervensubstanz gegen Virüsinfektion ab ingestis und nachfolgende subkutane Infektion mit Straßen- und fixem Virus, p. 596.

—, Vergleich der Kraft konzentrierten und verdünnten Antiwut- und Impfstoffserums, p. 597.

—, Wirkung des Sonnenlichtes auf das Antiwutserum, p. 603.

**Franchini, G.**, Experimentelle Tropendysenterie. Die Entamoeba beim Affen, p. 590.

**Knoll, W.**, „Säurefest“ und „Antiforminfest“. Kritisches zu diesen beiden Begriffen, p. 605.

**Knuth, Paul**, Erwiderung auf den Artikel des Herrn Prof. Dr. Miessner, „Die Milzruptur bzw. perakute Form der Hämoglobinurie des Rindes“, p. 557.

**Köbele, Wilhelm**, Untersuchungen über die hämolytische Wirkung der Kolostralmilch der Kuh, p. 561.

**Müller, M.**, Bemerkung zur Schnelldiagnose des Rotzes, p. 607.

**Preisz, Hugo**, Die Schutzwirkung der Kapsel für den Milzbrandbacillus, p. 556.

**Skschivan, Th. u. Stschastny, S.**, Ueber einen Fall von Pestübertragung durch Putorius foetidus, p. 545.

**Smith, Theobald u. Fabyan, Marshal**, Ueber die pathogene Wirkung des Bacillus abortus Bang, p. 549.

## Inhaltsverzeichnis.

### I. Verzeichnis der in Band 61 enthaltenen Arbeiten.

- Abramow, S.**, Zur Frage über die Streptothrichosen des Zentralnervensystems. 481
- Bäcker, St. und Menschikoff, V. K.**, Ueber die ätiologische Bedeutung des Bordet'schen Keuchhustenbacillus und den Versuch einer spezifischen Therapie der Pertussis. 218
- und **Laub, M.**, Zur Frage der antiinfektiösen Wirkung des Diphtherieheilserums. 254
- und **Wakushima, T.**, Das Verhalten des opsonischen Komplementes und der Antikörper bei der Anaphylaxie. 238
- Berka, F.**, Zur Tuberkelbacillenfärbung. 604
- Bezzola, Carlo**, Contribution à la connaissance des modifications de la résistance des animaux vis-à-vis des microorganismes pathogènes. II. Choléra. 133
- Blanc, Le s. Le Blanc.**
- Cardamatis, Jean P.**, Etude biologique et histologique de deux nouveaux Trypanosomes chez un chardonneret de nos pays. 98
- , Observations hématologiques sur 87 cas de mégalo splénie paludéenne. 382
- , Observations microbiologiques et histologiques sur 80 cas de fièvre bilieuse hémogloburique. 378
- et **Photinos, Soerate**, Etude biologique et histologique sur les trypanosomes chez les bovidés de Grèce. 538
- Carini, A.**, Zur Frage der Doppelkernigkeit mancher Hämogregarinen. 542
- Chatterjee, G. C.**, On the cultivation of black variety of Mycetoma. 358
- Clurea, Joan**, Ueber Spiroptera strongylina Rud. 128
- Conradl**, Zum Nachweis der Typhusbacillen im Blut. 170
- Cosco, Giuseppe**, Untersuchungen über die Tuberkulose der Milchkühe. Vorläufige Mitteilung. 59
- Croner, Fr.**, Beitrag zur Theorie der Desinfektion. 175
- Döhle**, Leukocyteinschlüsse bei Scharlach. 63
- v. Eisler, M. und Löwenstein, E.**, Ueber Formalinwirkung auf Tetanustoxin und andere Bakterientoxine. 271
- Fabian, Marshal s. Smith, Theobald.**
- Fermi, Claudio**, Fliegenlarven und Tollwutvirus. Lyssizide Wirkung und Virusübertragung. 93
- , Immunisation durch mündliche Verabreichung normaler Nervensubstanz gegen Virusinfektion ab ingestis und nachfolgende subkutane Infektion mit Straßen- und fixem Virus. 596
- Fermi, Claudio**, Kann das fixe Hundevirus an Stelle des fixen Kaninchenvirus zur Bereitung von Wutimpfstoff dienen? 407
- , Vergleich der Kraft konzentrierten und verdünnten Antiwut- und Impfstoffserums. 597
- , Wirkung der Fette auf das Tollwutvirus. 494
- , Wirkung des Sonnenlichtes auf das Antiwutserum. 603
- Flu, P. C.**, Beitrag zur Lösung der Frage, ob Schistosomum Mansoni identisch ist mit Schistosomum haematobium. 389
- Franchini, G.**, Experimentelle Tropendysenterie. Die Entamoeba beim Affen. 590
- Frei, Wilhelm**, Ueber einige Anreicherungs- und Färbemethoden der Tuberkelbacillen im Sputum. 411
- Gál, Felix**, Die Rolle der Gärungspilze in der Ätiologie des Typhus. 1
- Galli-Valerio, B.**, Ein kleiner Apparat für die Färbung der Präparate mittels Leishman-Verfahren. 190
- , Recherches sur la spirochétiase des poules de Tunisie et sur son agent de transmission: Argas persicus Fischer. 2<sup>a</sup> Mémoire. 529
- De Gasperi, Federico**, Ueber die Bedeutung der Thermopräzipitinreaktion nach Ascoli für die Diagnose des Milzbrandes. Experimentelle Untersuchungen. 184
- Gonder, Richard**, Untersuchungen über arzneifeste Mikroorganismen. I. Trypanosoma Lewisi. 102
- v. Graff, Erwin und Menschikoff, V.**, Experimentelle Beiträge zum Mechanismus der Antitoxinwirkung. 226
- Hadley, Phillip P.**, Studies on fowl cholera. I. A biological study of ten strains of the fowl cholera organism. 323
- Hammerschmidt, J. s. Kraus, R.**
- Horn, A. und Huber, E.**, Ein Beitrag zur Bakterienflora des Darmes gesunder erwachsener Rinder, mit besonderer Berücksichtigung der Paratyphusbacillus-B-ähnlichen Bakterien. 452
- Huber, E. s. Horn, A.**
- Huntmüller**, Befunde bei Maul- und Klauenseuche. 375
- Iivento, A.**, Charaktere der aus dem Trinkwasser einiger Schiffe isolierten Vibrionen. 344

- Karsner, H. T.**, Die Lungen bei der Anaphylaxie. 247
- Knoll, W.**, „Säurefest“ und „Antiformin-fest“. Kritisches zu diesen beiden Begriffen. 605
- Knuth, Paul**, Erwiderung auf den Artikel des Herrn Prof. Dr. Miessner „Die Milzruptur bzw. perakute Form der Hämoglobininurie des Rindes“. 557
- Köbele, Wilhelm**, Untersuchungen über die hämolytische Wirkung der Kolostralmilch der Kuh. 561
- Körmöczl, Emil**, Ueber protozoenähnliche Gebilde des Blutes. 366
- Kraus, R., Hammerschmidt, J. und Zia, Zeky**, Weitere Studien über Cholera-vibrionen. Ueber das Verhalten der aus der Epidemie in Arabien 1908 stammenden Cholera-vibrionen bei der Agglutination mit niederwertigem Serum. 207
- Kudicke, R.**, Beiträge zur Biologie der Trypanosomen. 113
- Kulka, W.**, Ueber die Bildung phosphorhaltiger Gase bei Fäulnis, zugleich ein Beitrag zur Biologie des *B. putrificus* Bienstock. 336
- Laub, M. s. Bücher, St.**
- Le Blanc, Emil**, Zur Artenfrage der Streptokokken. 68
- Löwenstein, E. s. v. Elsler, M.**
- Menschikoff, V. K. s. Bücher, Graff.**
- Müller, M.**, Bemerkung zur Schnell Diagnose des Rotzes. 607
- Napolitani, Melchiorre s. Tedeschi, Aldo.**
- Northrup, Zae**, The influence of the products of lactic organisms upon *Bacillus typhosus*. 417
- Odaira**, Beiträge zur Kenntnis der hämoglobiphilen Bacillen, mit besonderer Berücksichtigung des Bordetischen Bacillus. 289
- Ozaki, Y.**, Ein Beitrag zur Aetiologie des fötiden Eiters. 442
- Pesci, G.**, Einflüsse der verschiedenen Toxine (Tuberkulin und Tetanustoxin) auf die Lipolyse durch Organe. 142
- Photinos, Socrate s. Cardamatis, Jean, P.**
- Preis, Hugo**, Die Schutzwirkung der Kapsel für den Milzbrandbacillus. 558
- Rösler, Karl**, Ueber den Nachweis der Typhusbacillen im Wasser mittels Komplementablenkung. 166
- Rolly, Fr.**, Experimentelle bakteriologische Untersuchungen von verschiedenen Streptokokkenstämmen. 86
- Schern, Kurt**, Ueber Bakterien der Paratyphusgruppe und ihre Beurteilung vom hygienischen Standpunkt. 15
- Shmamine, Tohl**, Eine einfache Schnellfärbungsmethode von Spirochäten. 410
- Skschivan, Th. und Stschastny, S.**, Ueber einen Fall von Pestübertragung durch *Putorius foetidus*. 545
- Smith, Theobald und Fabyan, Marshal**, Ueber die pathogene Wirkung des *Bacillus abortus* Bang. 549
- Stanziale, Rodolfo**, Weitere Untersuchungen über die Inokulierbarkeit leprösen Materials in die vordere Augenkammer von Kaninchen. III. Mitteilung. 308
- Stschastny, S. s. Skschivan, Th.**
- Stühmer, A.**, Zur Technik der Untersuchung der Lumbalflüssigkeit auf Wassermannsche Reaktion. 171
- Suzuki, Yoshio und Takaki, Zenzo**, Ueber die Beziehung zwischen der v. Pirquet-schen Reaktion und den Tuberkelbacillen im Blut. 149
- Swellengrebel, N. H.**, Zur Kenntnis des Dimorphismus von *Trypanosoma gambiense* (var. *rhodesiense*). 193
- Takaki, Zenzo s. Suzuki, Yoshio.**
- Tedeschi, Aldo und Napolitani, Melchiorre**, Experimentelle Untersuchungen über die Aetiologie des Sommerfiebers. 502
- Tizzoni, Guido**, Ueber die Existenz eines spezifischen Präzipitins im Blute der Pellagrakranken. Vorläufige Mitteilung. 403
- Wakushima, T. s. Bücher, St.**
- Wills, Fred. F.**, The relationship of the acid-fast bacilli. 37
- Zia, Zeky s. Kraus, R.**
- v. Zubrzycki, J.**, Ueber die Aktivierung des Kobragiftes durch Organextrakte. 232

## II. Sachverzeichnis.

- Abort**, seuchenhafter, der Rinder, durch *Bac. abortus* verursacht. 549
- Agglutination**, *Bac. paratyphi* ähnlicher Bakterien. 463
- und Ueberempfindlichkeit. 245
- des *Vibrio cholerae*. 207
- Agglutinine** und Ueberempfindlichkeit. 245
- Affen-, Amöbenruhr**, experimentelle. 590
- Ammoniak** zum Tbc-Bacillennachweise. 412
- Anaphylaxie** s. Ueberempfindlichkeit.
- Antagonismus** von *Bac. typhi* und Milchsäurebakterien. 417
- Antiformin** zum Tbc-Bacillennachweise. 412
- Antiformin**festigkeit bei *Bac. tuberculosis*. 605
- Antikörper**, Bildung durch Bakterien, säurefeste. 37
- , trypanozide. 118
- und Ueberempfindlichkeit. 238
- Antitoxin**, Tetanus-, Wirkungsmechanismus. 226

- Antitoxin-Wirkung, Mechanismus. 226  
 Antitrypsin, Bildung durch *Bac. coli*. 9  
 Apparat zur Färbung (Leishman-Verfahren). 190  
*Argas persicus*, Rolle bei der Spirochätose der Hühner. 529  
 Arsen-Festigkeit des *Trypanosoma lewisi*. 102  
 — von Trypanosomen. 102. 115  
 Arznei-Festigkeit von Mikroorganismen. 102. 115  
*Ascaris lumbricoides* und Wut-Virus. 97  
 Atoxyl, Behandlung der Trypanosomiasis. 204  
 —, Wirkung auf Trypanosomen. 204  
 Auge, Leprainokulation beim Kaninchen. 308  
 Auswurf Tuberkulöser, Tbc-Bacillen-Nachweis. 411  
 Autolyse, Wirkung von Tetanustoxin. 142  
 —, — von Toxinen. 142  
 —, — von Tuberkulin. 142  
*Bacillus abortus*, seuchenhafter Abort der Rinder, Ursache desselben. 549  
 — —, Kultur. 553  
 — —, Pathogenität. 549  
 — —, Vorkommen in der Milch. 555  
 — *acidi lactici*, Wirkung auf *Bac. typhi*. 421  
 — *anthracis* s. a. Milzbrand.  
 — —, Kapsel, Schutzwirkung derselben. 556  
 —, Blindschleichen- s. Blindschleichen-Bacillus.  
 — *coli*, Antitrypsinbildung. 9  
 — —, Symbiose mit *Saccharomyces*. 7  
 — —, Virulenz, Steigerung durch Hefen. 7  
 — *diphtheriae* s. a. Diphtherie.  
 — —, Toxin, Wirkung von Formalin. 284  
 — —, Wirkung von Diphtherieserum. 255  
 — *dysenteriae*, Toxin, Wirkung von Formalin. 285  
 — *enteritidis* Gärtner, Differentialdiagnose von *Bac. paratyphi*. 23. 31  
 — — —, Fleischvergiftung, Ursache derselben. 15. 452  
 — — —, Nahrungsmittelvergiftung, Ursache derselben. 15. 452  
 — — —, Vorkommen im Fleische. 15  
 — *faecalis alcaligenes*, morphologische und kulturelle Eigenschaften. 477  
 — — —, Vorkommen im Darne. 477  
 —, Geflügelcholera-, Biologie. 323  
 —, Gras- s. a. *Bacillus*, Timothee-.  
 —, Harn-, Komplementbindung. 43  
 — —, opsonischer Index. 55  
 — *influenzae*-ähnlicher, kulturelle Eigenschaften. 296  
 —, Keuchhusten-, Keuchhusten, Erreger desselben. 218. 289  
 — —, Komplementbindung. 220  
 — *lactis acidi*, Wirkung auf *Bac. typhi*. 419  
 — *leprae* s. a. Lepra.  
 — —, Komplementbindung. 43  
 — *paratyphi*, Anreicherung mittels Papajotin. 23  
*Bacillus paratyphi* ähnliche Bakterien, biologische, morphologische und kulturelle Eigenschaften. 455  
 — — —, Vorkommen im Darne. 455  
 — *paratyphi*, Differentialdiagnose von *Bac. enteritidis* Gärtner. 23. 31  
 — —, Fleischvergiftung, Rolle bei derselben. 15  
 — — —, Ursache derselben. 15. 452  
 — — -Gruppe, hygienische Bedeutung. 15  
 — —, Nahrungsmittelvergiftung, Ursache derselben. 15  
 — —, Vorkommen im Fleische. 15  
 — *putrificus*, Fäulniserreger. 338  
 — —, Gasbildung. 338  
 — —, Phosphorwasserstoffbildung. 336  
 — *tetani* s. a. Tetanus.  
 — —, Toxin, Wirkung auf die Autolyse. 142  
 — — —, — auf die Lipolyse. 142  
 — — —, — von Formalin. 271  
 —, Timothee-, Komplementbindung. 43  
 — —, opsonischer Index. 55  
 — *tuberculosis* s. a. Tuberkulose.  
 — —, Anreicherung. 411  
 — — —, — mit Ammoniak-Kalilauge. 412  
 — — —, — mit Antiformin. 412  
 — — —, — mit Kalilauge-Ammoniak. 412  
 — — —, — mit Ligroin. 412  
 — —, Antiforminfestigkeit. 605  
 — —, Färbung. 411. 604. 605  
 — —, Komplementbindung. 43  
 — —, Nachweis im Auswurfe. 411  
 — —, Säurefestigkeit. 605  
 — —, Vorkommen im Blute. 149  
 — — —, — in den Faeces. 61  
 — — —, — in der Milch. 59  
 — *typhi* s. a. Typhus abdominalis.  
 — —, Anreicherung mit Galle. 170  
 — —, Komplementbindung. 166  
 — — —, — zum Nachweise im Wasser. 166  
 — —, Lebensfähigkeit in Milch. 417  
 — — und Milchsäurebakterien, Antagonismus. 417  
 — —, Nachweis im Wasser. 166  
 — —, Symbiose mit *Torula rosea*. 2  
 — —, Wirkung von Milchsäurebakterien. 417  
 Bakteriämie bei Tuberkulose und Tuberkulinreaktion. 149  
 Bakterien, Antagonismus. 417  
 —, Eiterung, Ursache derselben. 442  
 —, Fäulnis. 336  
 —, Färbung. 411. 604. 605  
 —, Farbstoffbildung. 460  
 —, Fleischvergiftung, Ursache derselben. 15. 452  
 — —, Flora des Darmes. 452  
 —, Gasbildung. 336. 460  
 —, hämoglobinophile, Differenzierung. 303  
 — —, Keuchhusten, Rolle bei demselben. 289  
 — —, kulturelle Eigenschaften. 296  
 —, Indolbildung. 461  
 —, Kapselbildung. 556



Bakterien, Milchsäure- und Typhusbacillen,		Desinfizientien, Wertbestimmung.	175
Antagonismus.	417	Diphtherie s. a. <i>Bacillus diphtheriae</i> .	
—, Proteinochrombildung.	460	—, Behandlung mit Serum.	254
—, säurefeste, Antikörperbildung.	37	—, Immunisierung.	254
—, —, Eigenschaften.	37	— -Serum, Wirkung auf <i>Bac. diphtheriae</i> .	255
—, —, Komplementbindung.	42	— -Toxin, Wirkung von Formalin.	284
—, —, opsonischer Index.	54	<i>Diplococcus foetidus aerobius</i> n. sp., Eite-	
—, Schwefelwasserstoffbildung.	460	rung, Ursache desselben.	442
—, Symbiose mit Hefen.	1	— — — —, morphologische und kultu-	
—, Variation.	78. 90	relle Eigenschaften.	444
—, Vorkommen im Blute.	149. 170	Distelfink, Trypanosomen in demselben.	98
—, — im Darne.	452. 477		
—, — in den Faeces.	61. 452	Dreitagesfieber s. Pappataciefieber.	
—, — im Fleische.	15	Dysenterie-Toxin, Wirkung von Formalin.	285
—, — in der Milch.	59. 417. 555	Eiter, durch <i>Diplococcus foetidus aerobius</i>	
—, — im Schinken.	30	verursacht.	442
—, — im Wasser.	166. 344	<i>Entamoeba tetragena</i> , Affeninfektion.	590
—, — in Wurst.	30	Faeces, <i>Bac. tubercul.</i> in denselben.	61
—, Widerstandsfähigkeit des Organismus		—, Bakterien in denselben.	61. 452
gegen dieselben.	133	—, Hefen in denselben.	5
—, Wirkung von Karbolsäure.	178	—, <i>Saccharomyces</i> in denselben.	5
—, — von Leukocyten.	88	Färbung, Apparat.	190
—, — von Lysol.	179	— des <i>Bac. tubercul.</i>	411. 604. 605
—, — von Milch.	77	— der <i>Spirochaete dentium</i> .	410
—, — von Phenol.	178	— — <i>pallida</i> .	410
—, — von Plasma.	81	— — <i>refringens</i> .	410
—, — von Serum.	81	— der Trypanosomen.	541
Bakteriolyse und Galle.	135	Farbstoff, Bildung durch Bakterien.	460
Bakteriotropine und Opsonine, Beziehungen.	246	Fäulnis, durch <i>Bac. putrificus</i> verursacht.	338
Bakterizidie durch Diphtherieserum.	255	—, Gasbildung durch Bakterien.	336
— durch Leukocyten.	88	Fette, Wirkung auf Wutvirus.	494
— durch Milch.	77	Fink, Distel- s. Distelfink.	
— durch Plasma.	81	Fleisch, <i>Bac. enteritidis</i> Gärtner in dem-	
— durch Serum.	81	selben.	15
Blindschleichen-Bacillus, Komplementbin-		—, <i>Bac. paratyphi</i> in demselben.	15
dung.	43	—, Bakterien in demselben.	15
—, opsonischer Index.	55	— -Beschau, bakteriologische.	20
Blut-Alkaliagar als Elektivnährboden für		— -Fütterungsversuche an Mäusen.	21
Cholera vibrionen.	345	—, Schabe- s. Schabefleisch.	
Blut, <i>Bac. tubercul.</i> in demselben.	149	Fleischvergiftung, durch <i>Bac. enteritidis</i>	
Blut-Parasiten der Eidechsen.	542	Gärtner verursacht.	15. 452
Blut-Plasma, bakterizide Wirkung.	81	—, durch <i>Bac. paratyphi</i> verursacht.	15.
—, Wirkung auf Bakterien.	81		452
Blut, protozoenähnliche Gebilde desselben.	366	Fliegen, Infektionskrankheiten, Ueber-	
Blutegel und Wut-Virus.	97	tragung derselben.	93
Blutkörperchen, rote, protozoenähnliche		— -Larven, Wirkung auf Wutvirus.	93
Gebilde in denselben.	367	—, Wutübertragung.	93
Centralnervensystem, Streptothrichose.	481	Formalin, Wirkung auf Diphtherietoxin.	284
Cerebrospinalflüssigkeit, Komplementbin-		—, — auf Dysenterietoxin.	285
dung (Wassermann)	171	—, — auf Toxine.	271
Cholera s. a. <i>Vibrio cholerae</i> .		—, — auf Tuberkulin.	285
—	207	—, — auf Vibriotoxin.	283
—, Geflügel- s. Geflügel-Cholera.		Gärungspilze, Typhus, Rolle bei dem-	
—, Immunisierung.	138	selben.	1
—, Verbreitung durch Wasser.	344	Galle und Bakteriolyse.	135
Colostrum s. Kolostralmilch.		— zur Typhusbacillen anreicherung.	170
Darm, <i>Bac. faecal. alcalig.</i> in demselben.	477	— und Vibriolyse.	135
—, Bakterien in demselben.	452. 477	Gas, Bildung durch <i>Bac. putrificus</i> .	338
Desinfektion, Geschwindigkeitskonstante.	175	—, — durch Bakterien.	336. 460
— mit Karbolsäure.	177	Geflügel-Cholera, Bakteriologie.	323
— mit Lysol.	177	Glossina palpalis, Entwicklung des Try-	
— mit Phenol.	177	panosoma gambiense in derselben.	204
—, Theorie.	175		

- Gras-Bacillus s. a. Bacillus, Timothee-  
 Haematopinus spinulosus, Uebertragung  
 des Trypanosoma lewisi. 105  
 Hämoglobinurie der Rinder. 557  
 Haemogregarina tupinambis, Doppelkernig-  
 keit. 542  
 Hämogregarinen, Doppelkernigkeit. 542  
 Hämolyse durch Kobragift, Aktivierung  
 durch Organextrakte. 232  
 — — —, Aktivierung durch Serum. 234  
 — durch Kolostralmilch. 561  
 — durch Serum. 125. 580  
 — durch Streptokokken. 69. 89  
 Harn-Bacillus, Komplementbindung. 43  
 —, opsonischer Index. 55  
 Hefen, Bacillus coli, Virulenzsteigerung  
 desselben. 7  
 —, Symbiose mit Bac. coli. 7  
 —, — mit Bakterien. 1  
 —, Vorkommen in Faeces. 5  
 Hirn, Streptothrichose. 485  
 Hühner-Spirochätose. 529  
 —, durch Spirochaete anserina verursacht.  
 531  
 Immunisierung gegen Cholera. 138  
 — gegen Diphtherie. 254  
 — gegen Keuchhusten. 222  
 — gegen Tetanus. 226. 279  
 — gegen Trypanosomiasis. 116  
 — gegen Wut. 97. 407. 501. 596. 597. 603  
 Index, opsonischer, des Bacillus, Timothee-  
 — — —, des Blindschleichen-Bacillus. 55  
 — — —, des Harnbacillus. 55  
 — — —, bei Lepra. 55  
 — — —, säurefester Bakterien. 54  
 — — —, bei Tuberkulose. 55  
 — — —, bei Ueberempfindlichkeit. 241  
 Indol, Bildung durch Bakterien. 461  
 Infektionskrankheiten, Verbreitung durch  
 Fliegen. 93  
 —, — durch Wasser. 344  
 Käfer, Mehl- s. Tenebrio molitor.  
 Kalilauge zum Tbc-Bacillennachweise. 412  
 Kaninchen, Leprainokulation in das Auge.  
 308  
 Kapsel, Bildung bei Bac. anthracis. 556  
 Karbolsäure zur Desinfektion. 177  
 —, Wirkung auf Bakterien. 178  
 Kern der Hämogregarinen. 542  
 Keuchhusten, Aetiologie. 218. 289  
 —, Bac. Bordet-Gengou als Ursache. 218.  
 289  
 —, durch hämoglobinophile Bakterien ver-  
 ursacht. 289  
 —, Immunisierung. 222  
 —, Vaccination. 222  
 Kobragift, hämolytische Wirkung, Akti-  
 vierung durch Organextrakte. 232  
 — — —, Aktivierung durch Serum. 234  
 Kolostralmilch, hämolytische Wirkung. 561  
 Komplement-Abnahme bei Ueberempfind-  
 keit. 238  
 Komplementbindung mit Bac. leprae. 43  
 — mit Bacillus, Timothee-. 43  
 — mit Bac. tubercul. 43  
 Komplementbindung mit Bac. typhi 166  
 — bei Bakterien, säurefesten. 42  
 — mit Blindschleichen-Bacillus. 43  
 — (Wassermann) mit Cerebrospinalflüssig-  
 keit. 171  
 — mit Harnbacillus. 43  
 — mit Keuchhustenbacillus. 220  
 — (Wassermann) bei Lepra. 43. 312  
 — — bei Paralyse. 172  
 — zur Rotzdiagnose. 607  
 — zur Streptokokkendifferenzierung. 87  
 — (Wassermann) zur Syphilisdiagnose. 171  
 — — bei Tabes. 173  
 — mit Timotheebacillus. 43  
 — bei Tuberkulose. 43  
 — zum Typhusbacillennachweise im Wasser.  
 166  
 Lanolin, Wirkung auf Wutvirus. 495  
 Laus, Ratten- s. Haematopinus spinulosus.  
 Lepra s. a. Bacillus leprae.  
 —, Inokulation in das Kaninchenauge.  
 308  
 —, Komplementbindung (Wassermann) bei  
 derselben. 43. 312  
 —, opsonischer Index. 55  
 Leukocyten, bakterizide Wirkung. 88  
 — -Einschlüsse bei Scharlach. 63  
 —, protozoenähnliche Gebilde in denselben.  
 369  
 —, Wirkung auf Bakterien. 88  
 Ligroin zum Tbc-Bacillennachweise. 412  
 Lipolyse, Wirkung von Tetanustoxin. 142  
 —, Wirkung von Toxinen. 142  
 —, — von Tuberkulin. 142  
 Lungen bei Ueberempfindlichkeit. 247  
 Lysol zur Desinfektion. 177  
 —, Wirkung auf Bakterien. 179  
 Mäuse, Fleischfütterungsversuche. 21  
 —, Trypanosomiasis. 202  
 Magen, Spiroptera strongylina in demselben  
 beim Schweine. 128  
 Malaria. 378. 382  
 —, Blutuntersuchungen. 378. 382  
 —, Milztumor. 382  
 Maul- und Klauenseuche, mikroskopische  
 Befunde. 375  
 Megalosplenie, Malaria-, Blutuntersuchun-  
 gen. 382  
 Mehlkäfer s. Tenebrio molitor.  
 Mikroorganismen, Arzneifestigkeit. 102.  
 115  
 Milch, Bacillus abortus in derselben. 555  
 —, Bac. tubercul. in derselben. 59  
 —, Bac. typhi, Lebensfähigkeit in der-  
 selben. 417  
 —, Bakterien in derselben. 59. 417. 555  
 —, bakterizide Wirkung. 77  
 —, Kolostral-, hämolytische Wirkung. 561  
 — Wirkung auf Bakterien. 77  
 Milchkühe, Tuberkulose. 59  
 Milchsäure, Wirkung auf Bac. typhi. 417  
 Milzbrand s. a. Bacillus anthracis.  
 —, Diagnose mittels Präzipitation. 184  
 —, Thermopräzipitinreaktion. 184  
 Milzruptur bei Rindern. 557  
 Milztumor bei Malaria. 382

<b>Mycetoma</b> , schwarze Varietät, Kultur derselben.	358	<b>Rinder</b> , Trypanosomiasis.	538
<b>Nahrungsmittel-Vergiftung</b> , durch <i>Bac. enteritidis</i> Gärtner verursacht.	15. 452	—, Tuberkulose.	59
—, durch <i>Bac. paratyphi</i> verursacht.	15	<b>Rotz</b> , Diagnose mittels Komplementbindung.	607
<b>Nervensubstanz</b> zur Wutimmunisierung.	596	—, — mittels Serums.	607
<b>Neurologie</b> , Komplementbindung (Wassermann).	172	<b>Ruhr</b> s. a. <i>Bacillus dysenteriae</i> .	
—, Serumdiagnose.	172	—, Amöben- bei Affen, experimentelle.	590
<b>Olivienöl</b> , Wirkung auf Wutvirus.	495	— —, durch <i>Entamoeba tetragena</i> verursacht.	590
<b>Opsonine</b> .	54. 260	<b>Saccharomyces</b> , <i>Bacillus coli</i> , Virulenzsteigerung desselben.	7
— und Bakteriotropine, Beziehungen.	246	—, Symbiose mit <i>Bac. coli</i> .	7
—, Index des Blindschleichenbacillus.	55	—, Vorkommen in Faeces.	5
—, — des Harnbacillus.	55	<b>Säurefestigkeit</b> des <i>Bac. tubercul.</i>	605
—, — bei Lepra.	55	<b>Schabefleisch</b> , <i>Bac. paratyphi</i> in demselben.	20
—, — säurefester Bakterien.	54	<b>Scharlach</b> , Leukocyten-Einschlüsse.	63
—, — des Timothee-Bacillus.	55	—, Streptokokken, Rolle bei demselben.	88
—, — bei Tuberkulose.	55	<b>Schinken</b> , Bakterien in demselben.	30
—, — bei Ueberempfindlichkeit.	241	<b>Schistosomum haematobium</b> , Eier.	391
<b>Organ-Extrakte</b> , Kobragift-Aktivierung.	232	— —, Identität mit <i>Schistosomum mansoni</i> .	389
<b>Papajotin</b> zur Anreicherung des <i>Bac. paratyphi</i> .	23	— —, Morphologie.	389
<b>Pappataciefieber</b> und Sommerfieber, Beziehungen.	502	— <i>mansoni</i> , Eier.	391
—, Uebertragung durch <i>Phlebotomus pappatasi</i> .	518	— —, Identität mit <i>Schistosomum haematobium</i> .	389
<b>Paraffinöl</b> , Wirkung auf Wutvirus.	495	— —, Morphologie.	389
<b>Paralyse</b> , Komplementbindung (Wassermann).	172	<b>Schwarzwasserfieber</b> , histologische und mikrobiologische Untersuchungen.	378
<b>Parasiten</b> , Blut- der Eidechsen.	542	<b>Schwefelwasserstoff</b> , Bildung durch Bakterien.	460
<b>Paratyphus</b> .	15	<b>Schwein</b> , <i>Spiroptera strongylina</i> im Magen desselben.	128
<b>Pellagra</b> , Präzipitin bei derselben.	403	<b>Serum</b> , Agglutination des <i>Vibrio cholerae</i> .	207
<b>Pepton</b> und Ueberempfindlichkeit, Beziehungen.	242. 250	—, bakterizide Wirkung.	81
<b>Pertussis</b> s. Keuchhusten.		—, — Festigkeit der Trypanosomen.	123
<b>Pest</b> , <i>Putorius foetidus</i> , Uebertragung durch denselben.	545	—, hämolytische Wirkung.	125. 580
<b>Phagocytose</b> .	254	—, Kobragift-Aktivierung.	234
<b>Phenol</b> zur Desinfektion.	177	—, Ueberempfindlichkeit gegenüber demselben.	248
—, Wirkung auf Bakterien.	178	—, Wirkung auf Bakterien.	81
<b>Phlebotomus pappatasi</b> , Biologie.	514	—, — auf Trypanosomen.	118
— —, Uebertragung des Pappataciefiebers.	518	<b>Serumbehandlung</b> der Diphtherie.	254
— —, — des Sommerfiebers.	518	— des Tetanus.	226. 281
<b>Phosphorwasserstoff</b> , Bildung durch <i>Bac. putrificus</i> .	336	— der Wut.	597. 603
<b>Pilze</b> , Gärungs- s. Gärungspilze.		<b>Serumdiagnose</b> des Milzbrandes.	184
<b>Piroplasmose</b> der Rinder.	558	— des Rotzes.	607
<b>Präzipitation</b> zur Milzbranddiagnose.	184	— der Syphilis.	171
<b>Präzipitin</b> bei Pellagra.	403	<b>Sommerfieber</b> , Aetiologie.	502
<b>Proteinochrom</b> , Bildung durch Bakterien.	460	— und Pappataciefieber, Beziehungen.	502
<b>Protozoen</b> ähnliche Gebilde des Blutes.	366	—, Uebertragung durch <i>Phlebotomus pappatasi</i> .	518
<b>Psychiatrie</b> , Komplementbindung (Wassermann).	172	<b>Sonnenlicht</b> , Wirkung auf das Wut-Heilserum.	603
—, Serumdiagnose.	172	<b>Spirochaete anserina</b> , Geflügelspirochätose.	531
<b>Putorius foetidus</b> , Pestübertragung.	545	— dentium, Färbung.	410
<b>Ratten-Laus</b> s. <i>Haematopinus spinulosus</i> .		— —, Kultur.	410
<b>Ratten</b> , Trypanosomiasis.	103	— pallida, Färbung.	410
<b>Regenwürmer</b> und Wutvirus.	97	— —, Kultur.	410
<b>Rinder</b> , Abort, seuchenhafter, durch <i>Bac. abortus</i> verursacht.	549	— refringens, Färbung.	410
—, Hämoglobinurie.	557	<b>Spirochäten</b> , Färbung.	410
—, Milzruptur.	557	—, Kultur.	410
—, Piroplasmose.	558	<b>Spirochätose</b> der Hühner, Rolle des <i>Argas persicus</i> .	529

- Spiroptera strongylina*, Beschreibung, Vorkommen. 128
- Streptococcus* s. a. Streptokokken.
- *erysipelatos*, kulturelle und morphologische Eigenschaften. 71
  - *lacticus*, Wirkung auf *Bac. typhi*. 421
  - *longus pathogenes seu erysipelatos*, kulturelle und morphologische Eigenschaften. 71
  - *mitior seu viridans*, kulturelle und morphologische Eigenschaften. 72
  - *saprophyticus*, kulturelle und morphologische Eigenschaften. 72
  - *viridans*, kulturelle und morphologische Eigenschaften. 72
- Streptokokken s. a. Streptococcus.
- , Arteinheit. 68. 86
  - , Differenzierung. 68. 86
  - , — mittels Ueberempfindlichkeit. 89
  - , hämolytische Wirkung. 69. 89
  - , Komplementbindung. 87
  - , Pathogenität. 86
  - , Scharlach, Rolle bei demselben. 88
  - , Systematik. 68. 86
  - , Variation. 78. 90
- Streptothrichose des Hirns. 485
- Streptothrichosen des Zentralnervensystems. 481
- Streptothrix*, morphologische und kulturelle Eigenschaften. 492
- Symbiose des *Bac. coli* mit Hefen. 7
- des *Bac. typhi* mit *Torula rosea*. 2
  - von Bakterien und Hefen. 1
- Syphilis, Diagnose mittels Komplementbindung (Wassermann). 171
- , — — —, Bedeutung in der Neurologie. 172
  - , — — —, Bedeutung in der Psychiatrie. 172
  - , Serundiagnose. 171
  - , —, Bedeutung in der Neurologie. 172
  - , —, Bedeutung in der Psychiatrie. 172
- Tabes, Komplementbindung (Wassermann). 173
- Tenebrio molitor* und Wut-Virus. 97
- Tetanus s. a. *Bac. tetani*.
- -Antitoxin, Wirkungsmechanismus. 226
  - , Behandlung mit Serum. 226. 281
  - , Immunisierung. 226. 279
  - -Toxin, Wirkung auf die Autolyse. 142
  - , Wirkung von Formalin. 271
  - , — auf die Lipolyse. 142
  - , Vaccination. 279
- Thermopräzipitinreaktion bei Milzbrand s. Präzipitation zur Milzbranddiagnose.
- Timothee-Bacillus*, Komplementbindung. 43
- , opsonischer Index. 55
- Torula rosea*, Symbiose mit *Bac. typhi*. 2
- Toxin, Diphtherie-, Wirkung von Formalin. 284
- , Dysenterie-, Wirkung von Formalin. 285
  - , Tetanus-, Wirkung auf die Autolyse. 142
  - , —, — von Formalin. 271
  - , —, — auf die Lipolyse. 142
- Toxin des *Vibrio El Tor*, Wirkung von Formalin. 283
- , Wirkung auf die Autolyse. 142
  - , — von Formalin. 271
  - , — auf die Lipolyse. 142
- Tropen-Dysenterie, experimentelle. 590
- Trypanosoma s. a. Trypanosomen, Trypanosomiasis.
- *gambiense*, Dimorphismus. 193
  - — (*var. rhodesiense*), Dimorphismus. 193
  - —, Entwicklung in *Glossina palpalis*. 204
  - —, Trimorphismus. 193
  - *lewisi*, Arsenfestigkeit. 102
  - —, Entwicklung. 107
  - —, Uebertragung durch *Haematopinus spinulosus*. 105
  - *rhodesiense*, Dimorphismus. 193
  - —, Morphologie. 193
  - —, Trimorphismus. 193
- Trypanosomen s. a. Trypanosoma, Trypanosomiasis.
- , Arsenfestigkeit. 102. 115
  - , blepharoblastlose. 115
  - , Biologie. 98. 102. 113
  - , Entwicklung. 107
  - , Färbung. 541
  - , kulturelle Eigenschaften. 539
  - , Morphologie. 99. 104. 115. 193. 539
  - , neue, im Distelfink. 98
  - , Serumfestigkeit. 123
  - , Wirkung von Atoxyl. 203
  - , — von Serum. 118
- Trypanosomiasis s. a. Trypanosoma, Trypanosomen.
- , Behandlung mit Atoxyl. 204
  - , Immunisierung. 116
  - der Mäuse. 202
  - der Ratten. 103
  - der Rinder. 538
  - , Uebertragung durch *Haematopinus spinulosus*. 105
  - der Vögel. 98
- Tuberkulin zur Diagnose der Tuberkulose. 149
- , Wirkung auf die Autolyse. 142
  - , — von Formalin. 285
  - , — auf die Lipolyse. 142
- Tuberkulinreaktion, kutane, diagnostische Bedeutung. 149
- Tuberkulose s. a. *Bacillus tuberculosis*.
- , Auswurf, Tbc-Bacillen-Nachweis. 411
  - , Bakteriämie und Tuberkulinreaktion. 149
  - , Diagnose mittels Tuberkulins. 149
  - , Infektionsweg. 61
  - , Komplementbindung. 43
  - , opsonischer Index. 55
  - der Rinder. 59
- Tupinambis teguixin*, *Haemogregarina tupinambis* in derselben. 542
- Typhus abdominalis* s. a. *Bacillus typhi*.
- —, Aetiologie, Gärungspilze in derselben. 1
  - —, Diagnose, bakteriologische. 170

Typhus abdominalis, Gärungspilze, Rolle derselben.	1	Vibriolyse und Galle.	135
— —, Komplementbindung.	166	Vibrionen, Vorkommen in Wasser.	344
Ueberempfindlichkeit, Agglutinine bei derselben.	245	Vibriotoxin, Wirkung von Formalin.	283
—, Antikörperverhalten bei derselben.	238	Vögel, Trypanosomiasis.	98
—, Komplementabnahme.	238	Wasser, Bac. typhi-Nachweis.	166
—, Kriterien des anaphylaktischen Zustandes.	238. 247	—, Bakterien in demselben.	166. 344
—, Lungen bei derselben.	247	—, Choleraverbreitung.	344
— und Opsonine.	241	—, Infektionskrankheiten, Verbreitung derselben.	344
— und Peptonvergiftung, Beziehungen.	242. 250	—, Vibrio cholerae, Nachweis und Vorkommen in demselben.	344
— gegenüber Serum.	248	—, Vibrionen in demselben.	344
— zur Streptokokkendifferenzierung.	89	Wurst, Bakterien in demselben.	30
—, Symptome.	238. 247	Wut-Heilserum, Wirkung von Sonnenlicht.	603
Vaccination gegen Keuchhusten.	222	Wut, Immunisierung. 97. 407. 501. 596. 597.	603
— gegen Tetanus.	279	—, — mit Nervensubstanz [normaler].	596
Variation bei Bakterien.	78. 90	—, — mit Serum.	597. 603
— bei Streptokokken.	78. 90	—, Uebertragung durch Fliegen.	93
Vasolin, Wirkung auf Wutvirus.	495	— -Virus, Abschwächung durch Fliegenlarven.	93
Vibrio cholerae s. a. Cholera.		— des Hundes zur Impfstoffbereitung.	407
— —, Agglutination.	207	—, Wirkung von Ascaris lumbricoides.	97
— —, Anreicherung.	344	—, — von Blutegeln.	97
— —, — durch Blutalkaliagar.	345	—, — von Fetten.	494
— —, Nachweis im Wasser.	344	—, — von Fliegenlarven.	93
— —, Vorkommen im Wasser.	344	—, — von Regenwürmern.	97
— —, Widerstandsfähigkeit des Organismus gegen denselben.	133	—, — von Tenebrio molitor.	97
— El Tor, Toxin, Wirkung von Formalin.	283	Zentralnervensystem, Streptothrichose.	481

### III. Verzeichnis der Abbildungen.

Affen, Amöbenruhr, experiment.	592	Kern der Hämogregarinen.	543
Apparat für Färbung nach Leishman.	191	Leber, durch Schistosomum mansoni verändert.	395
— für Gasbildung durch Bakterien.	339. 341	Lepra, Inokulation in das Kaninchenaugen. (Taf. I—V.)	322
Auge, Leprainokulation beim Kaninchen. (Taf. I—V.)	322	Leptodactylus ocellatus, Erythrocyt.	543
Bacillus pestis in Halslymphdrüse des Iltis.	547	Leukocyten-Einschlüsse bei Scharlach.	65. 66
Bakterien, Gasbildung, Apparat.	339. 341	Lungen bei Ueberempfindlichkeit.	249—251
Darm, Amoeba tetragena-Infektion.	592	Lymphdrüse von Putorius foetidus, Pestbacillen in derselben.	547
Diplococcus foetidus aërobius, kult. Eigenschaften.	445	Madurafuß. (Taf. I, II.)	365
Distelfink, Trypanosomen. (Taf.)	102	Malaria, Milztumor.	385
Entamoeba tetragena, Affeninfektion.	592	Maul- u. Klauenseuche, histolog. Befunde. (Taf. I, II.)	378
— —, Morphol. (Taf.)	594	Megalosplenie bei Malaria.	385
Färbung nach Leishman, Apparat.	191	Milztumor bei Malaria.	385
Fink s. Distelfink.		Mycetom, schwarze Varietät, Kultur. (Taf. I.)	365
Gasbildung durch Bakterien, Apparat.	339. 341	Putorius foetidus, Pestbacillen in der Halslymphdrüse.	547
Geflügel-Spirochätose, mikrosk. Befunde.	533. 535. 536	Rinder, Trypanosomen derselben. (Taf.)	542
Haemogregarina tupinambis, Kern.	543	Scharlach, Leukocyten-Einschlüsse.	65. 66
Hämogregarinen, Kern.	543	Schistosomum mansoni, Eierstock, Ootyp usw.	401
Hühner-Spirochätose, mikrosk. Befunde.	533. 535. 536	— —, Leberveränderung.	395
Kaninchen, Leprainokulation in das Auge. (Taf. I—V.)	322		

- Spirochaete anserina*, Morphol. 533. 535  
*Spirochätose*, Hühner-, mikrosk. Befunde. 533. 535. 536  
*Spiroptera strongylina*, Anatomie. (Taf.) 131. 133  
*Streptothrichose* des Zentralnervensystems. 485. 488  
*Streptothrix*, Morphologie. 488  
*Trypanosoma gambiense*, Morphologie. 201. 203. 205  
*Trypanosoma rhodesiense*, Morphol. 201. 203. 205  
*Trypanosomen*, Morphol. (Taf.) 201. 203. 205. 542  
—, neue, im Distelfink. (Taf.) 102  
*Tupinambis teguixin*, Erythrocyt. 543  
Ueberempfindlichkeit, Lungen bei derselben. 249—251  
Zentralnervensystem, *Streptothrichose*. 485. 488



---

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena. — 4035

---

# CENTRALBLATT

für

## Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Erste Abteilung:

Mediz.-hygien. Bakteriologie u. tier. Parasitenkunde

Originale

in Verbindung mit

Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Loeffler,  
Greifswald

Geh. Med.-Rat Prof. Dr. R. Pfeiffer,  
Breslau

Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. M. Braun  
Königsberg i. Pr.

herausgegeben von

Prof. Dr. O. Uhlworm in Berlin W. 15, Hohenzollerndamm 4<sup>II</sup>

Verlag von Gustav Fischer in Jena

61. Bd.

Jena, den 16. Dezember 1911.

Heft 4/5

Preis für den Band (50 Bogen) 15 Mark. Schwierige Tafeln werden einem Bogen gleich gerechnet. — Die Nummern erscheinen zwanglos je nach dem vorliegenden Stoffe. Bei Einzelverkauf Preis für einen einfachen Druckbogen 40 Pf., für eine Tafel 60 Pfg.

### Paul Altmann

Luisen-Strasse 47  
Ecke Schumannstrasse.

Berlin N.W.,

Luisen-Strasse 47  
Ecke Schumannstrasse.

### Fabrik und Lager

aller Apparate und Utensilien für Chemie, Bakteriologie,  
Mikroskopie und Hygiene.

Vollständige Einrichtungen  
von

bakteriolog.-mikroskop. Laboratorien,  
sowie

hygienisch-chemischen Arbeitsstätten

Dampf-Desinfektionsapparate.

Neue Wasseruntersuchungsapparate.

Spezialität: Brutschränke  
in dauerhafter, zweckmässiger Aus-  
führung und jeder Grösse.

Serodagnostische Apparate.

Schüttelapparate — Centrifugen.

Gefrierapparate.



Ausführliche illustrierte Kataloge  
an Interessenten gratis

Digitized by

Google

Original from  
COLUMBIA UNIVERSITY



# Dr. Rob. Muencke

G. m. b. H.

BERLIN NW. 6, Luisenstr. 58.

Fabrik und Lager

sämtlicher Apparate und Utensilien für

**Bakteriologie, Chemie,**

**Mikroskopie**

und Medizinisch-chemische Untersuchungen.

Einrichtung und Ergänzungen von

**Laboratorien**

für **Krankenhäuser und Ärzte**

Brutschränke, Thermostaten, Sterilisatoren. Thermo-

regulatoren für Gas- und elektrische Heizung,

Mikroskope, Objektträger etc.

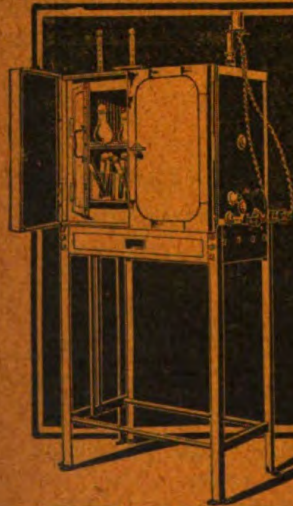
Eigene Mechanische Werkstätte — Glas-  
und Quarzglasbläserei — Klempnerei.



**Neuer bakteriolog. Katalog erschienen**

an Interessenten gratis und franko.

## BRUTSCHRÄNKE



für elektrische Heizung

für Gas-Heizung

für Petroleum-Heizung

liefern in unerreichter Güte

**F. & M. LAUTENSCHLAGER**

BERLIN N.

KÖNIGL. HOF-LIEFERANT.

Chausseestr. 92

## **Merck chem. Fabrik, Darmstadt**

liefert:

**Alle Präparate für mikroskopische Zwecke,**

mikrochemische Reagentien, Farbstoffe, Farbstoffkombinationen, Här-  
tungs- und Einbettungsmittel, Untersuchungsflüssigkeiten, Einschluss-  
medien und Nährböden etc., sowie alle Präparate für photogr. Zwecke.

Digitized by

Google

Zu beziehen durch sämtliche Apotheken und

Original from  
COLUMBIA UNIVERSITY



# Zum Jahreswechsel

empfehlen wir uns zur Annahme von Abonnements auf folgende, wie sämtliche sonstigen Zeitschriften des In- und Auslandes, die stets am Tage des Erscheinens an die angegebenen Adressen zur Absendung gebracht werden:

<b>Anatomischer Anzeiger.</b>	pro Band Mk.	16.—
<b>Archiv für mikroskopische Anatomie.</b>		
Preise verschieden pro Band ca.	"	60.—
<b>Archiv für klin. Chirurgie.</b>	Preise versch. pro Band ca.	" 37.—
<b>Archiv für Dermatologie und Syphilis.</b>	pro Band	" 18.—
<b>Archiv für Hygiene.</b>	pro Band	" 16.—
<b>Archiv für Laryngologie.</b>	Preise versch. pro Band ca.	" 23.—
<b>Archiv für klinische Medizin.</b>	pro Band	" 16.50
<b>Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie.</b>	pro Band	" 16.50
<b>Archiv für Verdauungskrankheiten.</b>	pro Band	" 24.—
<b>Bruns' Beiträge zur klinischen Chirurgie.</b>		
Preise verschieden pro Band ca.	"	40.—
<b>Centralblatt für allgemeine Pathologie u. patholog. Anatomie.</b>	pro Jahrg.	" 26.—
<b>Fortschritte auf dem Gebiete der Röntgenstrahlen.</b>	pro Band	" 30.—
<b>Mitteilungen aus den Grenzgebieten der Medizin u. Chirurgie.</b>	pro Band	" 25.—
<b>Monatshefte für praktische Dermatologie.</b>	pro Band	" 20.—
<b>Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie.</b>		
Preise verschieden pro Band ca.	"	30.—
<b>Schmidts Jahrbücher der in- u. ausländischen gesamten Medizin.</b>	pro Jahrg.	" 36.—
<b>Therapie der Gegenwart.</b>	pro Jahrg.	" 10.—
<b>Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie.</b>	pro Band	" 16.—
<b>Deutsche medizinische Wochenschrift.</b>	pro Jahrg.	" 24.—
<b>Zeitschrift für Biologie.</b>	pro Band	" 24.—
<b>Zeitschrift für physiologische Chemie.</b>	pro Band	" 12.—
<b>Zeitschrift für ärztliche Fortbildung.</b>	pro Jahrg.	" 10.—
<b>Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten.</b>		
Preise verschieden pro Band ca.	"	24.—
<b>Zeitschrift für Immunitätsforschung u. experimentelle Therapie.</b>	Originale pro Band	" 18.—
	Referate pro Band	" 22.—
<b>Zeitschrift f. Krebsforschung.</b>	Preise versch. pro Bd. ca.	" 25.—
<b>Zeitschrift für klinische Medizin.</b>	pro Band	" 16.—
<b>Zeitschrift für wissenschaftl. Mikroskopie.</b>	pro Band	" 20.—
<b>Zeitschrift für experimentelle Pathologie u. Therapie.</b>		
Preise verschieden pro Band ca.	"	28.—
<b>Zentralblatt für Bakteriologie.</b>	Originale: pro Band	" 15.—
	Referate: pro Band	" 15.—
<b>Ziegler's Beiträge zur patholog. Anatomie und allgem. Pathologie.</b>	pro Band	" 25.—

**SPEYER & PETERS**

BERLIN NW. 7, Unter den Linden 43



Soeben erschien:

Antiquariatskatalog 25 enthaltend die

# Bibliothek Franz von Winckels

früher Professor der Geburtshilfe und Gynäkologie  
an der Universität München.

Außer der umfangreichen **Zeitschriftenabteilung** und dem selten vollständigen **Handapparat** zeichnet sich die Bibliothek durch die besonders reichhaltige Abteilung **Aelterer Schriftsteller** aus, die auch Schriften aus anderen Gebieten der Medizin außer der Geburtshilfe und Gynäkologie enthält.

**Der Katalog wird auf Wunsch gratis zugesandt.**

---

Kürzlich erschienen ferner folgende Anzeiger antiquarischer Bücher:

**Anatomie, Physiologie, Entwicklungsgeschichte  
Chirurgie  
Psychiatrie, Neurologie  
Haut- und Geschlechtskrankheiten.**

---

Zur Einrichtung von Bibliotheken und zur Ergänzung  
vorhandener Bestände empfehlen wir besonders unser großes  
Lager medizinischer Zeitschriften.

## SPEYER & PETERS

BERLIN NW. 7, Unter den Linden 43















BUTLER

BIOLOGICAL SCIENCES LIBRARY  
COLUMBIA UNIVERSITY



